Einfluß der Glucosekonzentration auf die Glucoseutilisation, die Glucoseoxidation sowie die Pentosephosphatshunt-Aktivität bei Langerhansschen Inseln von fötalen, neugeborenen und trächtigen Ratten

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Heribert Düppenbecker
aus Geseke

1981

81 276

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548922_0014

Einfluß der Glucosekonzentration auf die Glucoseutilisation, die Glucoseoxidation sowie die Pentosephosphatshunt-Aktivität bei Langerhansschen Inseln von fötalen, neugeborenen und trächtigen Ratten

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Heribert Düppenbecker
aus Geseke

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 15.Juli 1981

Dekan: Prof. Dr. E. Reinhard

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.P.T. Ammon

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Reinhard

Die vorliegende Arbeit wurde im November 1977 unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H.P.T. Ammon am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen begonnen und im Mai 1981 abgeschlossen.

Herrn Professor Dr. H.P.T. Ammon
danke ich für die zahlreichen Anregungen und die freundliche Unterstützung bei dieser Arbeit.

Ferner danke ich allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Herrn Prof. Ammon für stete Diskussionsbereitschaft und gute Zusammenarbeit.

Abkürzungen

Acetyl-CoA	aktivierte Essigsäure
6-AN	6-Aminonicotinamidsäure
t-BHP	tert. Butylhydroperoxid
p-CMB	p-Chlormercuribenzoat
cpm	counts per minute = Zählrate pro Minute
cAMP	cyclisches Adenosin-3,5-monophosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DIP	Diazodicarbonsäure-bis-(N'-methylpiperazid)
DIP+2	DIP-Salz Dijodsalz des Diazodicarbonsäure-bis-(N'-methylpiperazids)
dpm	disintegrations per minute = Zerfälle pro Minute
E	Einheiten
ESR	external standard ratio = externes Standard-Kanal-Verhältnis
% η	"efficiency" = Zählausbeute in Prozent
F	Föten (21. Tag p.c.)
F-6-P	Fructose-6-phosphat
F-1,6-P_2	Fructose-1,6-biphosphat
G-6-P	Glucose-6-phosphat
GSH	Glutathion (reduziert)
GSSG	Glutathion (oxidiert)
IRI	immunoreaktives Insulin
KRB-Lösung	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung
LSC	liquid scintillation counter
M	trächtige Ratten, "Mütter"
μE	Mikroeinheiten
mmol	Millimol
mM	millimolar
min	Minute
N	neugeborene Ratten (5. Tag p.p.)
N.S.	nicht signifikant
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert

NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduziert
p	Probability
pmol	pikomol
p.c.	post coitum
p.p.	post partum
POPOP	2,2'-p-Phenylen-bis(5-phenyloxazol)
PPO	2,5-Diphenyloxazol
PPS	Pentosephosphatshunt
SEM	Standard Error of the Mean
sy	'specific yield'
γ	1 μg = 1 X 10^{-6} g

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1	EINLEITUNG	1
1.1	Stand der Forschung	1
1.2	Fragestellung	4
2	MATERIAL UND METHODIK	7
2.1	Geräte	7
2.2	Chemikalien	7
2.3	Reagenzlösungen zur DNA-Bestimmung	8
2.3.1	Diaminobenzoesäure-Reagenz	8
2.3.2	DNA-Standards	8
2.4	Szintillationslösungen	9
2.4.1	auf Dioxanbasis (Bray-Lösung)	9
2.4.2	auf Toluolbasis	9
2.5	Nähr- und Reagenzlösungen	10
2.5.1	Hanks' Lösung	10
2.5.2	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung (KRB-Lösung)	11
2.6	Inkubationslösungen	12
2.6.1	Vorinkubationslösung	12
2.6.2	Hauptinkubationslösung	13
2.7	Versuchstiere	14
2.7.1	Fötale Ratten	14
2.7.2	Neugeborene Ratten	16
2.7.3	Erwachsene Ratten	17

Seite

2.8 Isolierung Langerhansscher Inseln nach Lacy und Kostianovsky 18

2.8.1 Erwachsene Ratten 18

2.8.2 Fötale Ratten (21.Tag p.c.) 20

2.8.3 Neugeborene Ratten (5.Tag p.p.) 22

2.9 Vorinkubation 23

2.10 Hauptinkubation - Bestimmung der Aktivität des Pentosephosphatshunts (PPS) 24

2.10.1 THO-Bildung aus 5-^{3}H-Glucose 24

2.10.2 $^{14}CO_2$ - Bildung aus 1-^{14}C- und 6-^{14}C-Glucose 26

2.10.3 Quenchkurven 29

2.10.4 Glucosereinigung 34

2.11 Berechnung des Pentosephosphatshunts (PPS) 36

2.11.1 Berechnung der Glucoseutilisation 37

2.11.2 THO - Recovery 39

2.11.3 Berechnung der Glucoseoxidation im PPS 40

2.11.4 Durchführung der Berechnung 43

2.12 Versuchsablauf 45

2.12.1 Die THO - Bestimmung 45

2.12.2 Die $^{14}CO_2$ - Bestimmung 48

2.13 DNA - Bestimmung 49

2.14 Versuchsauswertung 51

Seite

3	VERSUCHSERGEBNISSE	51
3.1	Glucoseutilisation	52
3.2	Glucoseoxidation	54
3.3	Prozentualer Anteil des Pentose-phosphatshunts	60
3.4	Absolute Rate des Pentosephosphatshunts	62
3.5	Ergebnisse der DNA-Bestimmung	66
4	DISKUSSION	70
4.1	Biosynthese und Sekretion von Insulin in der Fötal- und Perinatalzeit	70
4.1.1	Biosynthese	70
4.1.2	Sekretion	72
4.1.2.1	Einfluß von Glucose	72
4.1.2.2	Primingeffekt	74
4.1.2.3	Einfluß von D-Glycerinaldehyd	76
4.1.2.4	Einfluß des Adenylatcyclasesystems	77
4.1.2.5	Einfluß von Aminosäuren und Sulfonyl-harnstoffen	79
4.2	DNA-Gehalt Langerhansscher Inseln	81
4.3	Glucoseoxidation in Langerhansschen Inseln	84
4.3.1	Glucoseoxidation über die Glykolyse	88
4.3.2	Glucoseoxidation über den PPS	89
4.3.3	Bedeutung des PPS für die Insulinsekretion	91

		Seite
5	ZUSAMMENFASSUNG	97
5.1	Fragestellung	97
5.2	Ergebnisse	97
5.3	Schlußfolgerungen	99
6	ANHANG	101
	Ergebnisse tabellarisch	
7	LITERATURVERZEICHNIS	105

1 EINLEITUNG

1.1 Stand der Forschung

Pankreasinseln von Föten verschiedener Tierspezies und auch des Menschen unterscheiden sich von den Inseln Neugeborener oder Erwachsener dadurch, daß sie nach Stimulation mit Glucose nicht zu einer angemessenen Insulinsekretion fähig sind. Dies ist nachgewiesen in vivo bei Schafen (1) und Primaten (2) einschließlich des Menschen (3) und in vitro bei Ratten (4), Kaninchen (5) und dem Menschen (6). Für fötale Rinderpankreata gilt das nicht (7). Man kann diese Sekretionsinsuffizienz als einen physiologischen Diabetes ansehen. Ein stimulatorischer Effekt der Glucose auf die Insulinsekretion erfolgt erst zwischen dem zweiten und dritten Tag nach der Geburt (4, 8, 9). Die Ursache für dieses unterschiedliche Verhalten der Inseln von Föten und von Erwachsenen ist nicht bekannt.
Der Mechanismus, über den Glucose und andere Stimulatoren die Langerhanssche Insel zur Sekretion von Insulin aus der B-Zelle veranlassen, ist nicht geklärt. Dem Stoffwechsel der Glucose in der Pankreasinsel wird dabei jedoch eine große Bedeutung zugemessen. Die Glucose wird in der B-Zelle zum einen über den Embden-Meyerhof-Abbau und zum

anderen über den Pentosephosphatshunt (PPS) verstoffwechselt (10, 11, 12, 13).

Die Aktivität des glykolytischen Abbaus korreliert mit der durch Glucose induzierten Insulinfreisetzung (10). Wird der glykolytische Abbau durch Verwendung von 2-Desoxyglucose oder Jodacetat (14, 15, 16) behindert, so tritt beim Jodacetat eine Hemmung der glucoseabhängigen Insulinsekretion selbst in Anwesenheit von Pyruvat ein, das für eine ausreichende ATP-Produktion (Energieversorgung) sorgt ohne selbst eine Insulinsekretion auszulösen (17, 18, 19). 2-Desoxyglucose unterbindet den Reaktionsschritt vom Glucose-6-phosphat zum Fructose-6-phosphat und Jodacetat hemmt u.a. die Glycerinaldehyd-Dehydrogenase und verhindert somit die Bildung von 1,3-Diphosphoglycerat (20). Der Glucoseabbau über die Glykolyse ist also für die insulinfreisetzende Wirkung der Glucose erforderlich.

Bereits 1972 wurde von Ammon und Steinke (21, 22) untersucht, ob der Glucoseabbau über den PPS mit der Sekretion von Insulin in einem Zusammenhang steht. Sie zeigten, daß eine Hemmung des PPS durch 6-Aminonicotinamid (6-AN), einem Antimetaboliten der Pyridinnucleotidsynthese, stets zu einer Hemmung der glucoseinduzierten Insulinausschüttung führt.

Weitere Ergebnisse von Ammon et al.(23) weisen darauf hin, daß insbesondere dem NADPH, welches zum großen Teil aus der Oxidation der Glucose im PPS stammt, eine Bedeutung im Mecha-

nismus der Insulinsekretion zukommt. Für eine solche Bedeutung des NADPH spricht vor allem, daß der NADPH/NADP-Quotient der Pankreasinsel von der Glucosekonzentration abhängig ist, die ihrerseits in Korrelation zur freigesetzten Insulinmenge steht (23). Inkubiert man Pankreasinseln in Gegenwart von Methylenblau, welches NADPH zu NADP oxidiert, so fällt der NADPH/NADP-Quotient dosisabhängig ab und die durch Glucose stimulierte Insulinsekretion wird vermindert (24).

Für eine Bedeutung des PPS bei der Insulinsekretion sprechen weitere Befunde aus unserem Arbeitskreis bei denen gezeigt werden konnte, daß sowohl der prozentuale Anteil des PPS an der Glucoseoxidation (25) als auch die absolute Menge Glucose, die über den PPS verstoffwechselt wird, glucoseabhängig ist, was auch für die Insulinsekretion gilt. Nach Untersuchungen von Iversen und Miles (26), Rapaport et al.(27), Frerichs et al. (28) und Loreti et al. (29) hemmt Insulin im Inkubationsmedium seine eigene Sekretion. Ammon und Verspohl (30) und Assal et al. (31) untersuchten den Einfluß von exogenem Insulin auf den Pentosephosphatshunt an der isolierten Pankreasinsel und fanden bereits bei Konzentrationen von 400 E IRI/ml eine Abnahme der Glucoseoxidation über den PPS sowie eine Erniedrigung des NADPH/NADP-Quotienten.

Heinze und Steinke (9) berichteten, daß in vitro bei Verwendung von 1-^{14}C- und 6-^{14}C-Glucose (16,7 mM Glucose

im Medium), die Oxidation 1-^{14}C markierter Glucose bei Inseln von Rattenföten etwa gleich groß oder sogar niedriger ist, als die Oxidation von 6-^{14}C markierter Glucose. Dagegen ist bei trächtigen Ratten die 1-^{14}C-Oxidation wesentlich größer als die 6-^{14}C-Glucoseoxidation. Ein ähnliches Bild wie trächtige zeigen auch neugeborene Ratten am fünften Tag nach der Geburt. Die Autoren vermuten, daß Inseln von Föten die Glucose nicht über den PPS verstoffwechseln. Beziehungen zwischen der Glucosekonzentration und der Aktivität des PPS wurden jedoch von den Autoren nicht hergestellt. Auch fand die unterschiedliche Größe der Inseln, die sich zwischen den Inseln von Föten einerseits und denen der Muttertiere andererseits ergibt, bei den Autoren keine Berücksichtigung.

1.2 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob bei Verwendung von steigenden Glucosekonzentrationen im Inkubationsmedium (5,6; 11,1 und 16,7 mM) Unterschiede zwischen den Inseln von fötalen, fünf Tage alten und trächtigen Ratten hinsichtlich

der Glucoseutilisation,
der Oxidation 1-^{14}C markierter Glucose,
der Oxidation 6-^{14}C markierter Glucose

und der im PPS absolut bzw. prozentual verstoffwechselten Menge an Glucose
bestehen. Die Befunde, die zunächst auf die Zahl der im in vitro-Test eingesetzten Inseln bezogen werden, sollten sodann dem jeweiligen DNA-Gehalt der Inseln von fötalen, neugeborenen und erwachsenen Ratten gegenübergestellt werden.

Die Befunde werden dann weiter unter dem Gesichtspunkt diskutiert, inwieweit das Versagen des PPS in den Inseln fötaler Ratten die Ursache für die auf Glucosereiz ausbleibende Stimulierung der Insulinsekretion sein könnte.

2 MATERIAL UND METHODIK

2.1 Geräte

Eppendorf-Reaktionsgefäße Nr. 3810	Eppendorf Gerätebau Netheler & Hinz GmbH, Hamburg
Fluorimeter FP 100	Baird-Atomic, Bedford Mass., U.S.A.
Gefriertrocknungsanlage Beta	Christ GmbH, Osterode
Isocap 300/Liquid Scintillation System	Nuclear-Chicago Corp., Illinois, U.S.A.
pH-Meter H5	Beckman Instruments GmbH, München
Schüttel-Wasserbad	Köttermann KG, Häningsen, BRD
Stereomikroskop, Citoval	Jenoptik Jena GmbH, DDR
Tischcomputer P 602	Olivetti GmbH
Zentrifuge 5413	Eppendorf Gerätebau Netheler & Hinz GmbH, Hamburg

2.2 Chemikalien

Aktivkohle, Norit A	Serva GmbH, Heidelberg
Carbogen (95% O_2 : 5% CO_2)	Mast, Tübingen
Collagenase 0,73 U/mg material	Serva GmbH, Heidelberg
3,5- Diamino-benzosäure-dihydro-chlorid puriss.p.a.	Fluka AG, Buchs Schweiz
DNA aus Kälberthymus	Serva GmbH, Heidelberg
α-D-Glykose	Serva GmbH, Heidelberg
1-^{14}C-Glucose 50-60 mCi/mmol	Amersham Buchler,
6-^{14}C-Glucose 45-60 mCi/mmol	Braunschweig
5- ^{3}H-Glucose 10-20 Ci/mmol	
Hyamine ^{R} Hydroxide	New England Nuclear Corp., Boston, USA
Insulin Antiserum	Novo Research Institute Copenhagen, Denmark
Rinderserumalbumin	Behringwerke, Marburg
^{3}H Wasser Standardlösung 2,105 μCi/g	Amersham Buchler Braunschweig

Alle anderen, hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt in der jeweils reinsten Form (p.a.) bezogen.

2.3 Reagenzlösungen zur DNA-Bestimmung

2.3.1 Diaminobenzoesäure-Reagenz

3,5- Diaminobenzoesäure-Dihydrochlorid wird (200 mg/ml) in destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wird mit 10mg Aktivkohle je ml umgeschüttelt und nach einigen Minuten Stehen bei Raumtemperatur drei Minuten lang bei 6500 g zentrifugiert. Der klare Überstand wird noch ein weiteres Mal ebenso mit Aktivkohle (10 mg/ml) gereinigt.
Das Diaminobenzoesäure-Reagenz wird jeweils frisch hergestellt.

2.3.2 DNA-Standards

DNA aus Kälberthymus wird (5 mg/5ml) in N-Ammoniaklösung (aus 25% NH_3 p.a.) gelöst. Anschließend wird einmal im Verhältnis 1:10 mit N-Ammoniaklösung verdünnt. Weitere Verdünnungen werden mit destilliertem Wasser hergestellt und Aliquots enthalten 400 ng, 200 ng, 150 ng, 100 ng, 50 ng und 25 ng DNA werden in Eppendorf-Gefäßen (wie auch zur DNA-Bestimmung verwendet) bei 60°C eingetrocknet. Die DNA-Standards werden verschlossen im Tiefkühlschrank (-20°C) aufbewahrt.

2.4 Szintillationslösungen

2.4.1 auf Dioxanbasis (Bray-Lösung)

Dioxan	440,0 ml
Äthylenglykol	10,0 ml
Methanol	50,0 ml
PPO	1,9 g
Naphthalin	30,0 g

Diese Lösung dient zur Aufnahme wäßriger Proben.

2.4.2 auf Toluolbasis

PPO	4,00 g
POPOP	0,05 g
Toluol	ad 1000,0 ml

Diese Lösung dient zur Aufnahme von Proben, die Hyaminhydroxid enthalten.

2.5 Nähr- und Reagenzlösungen

2.5.1 Hanks' Lösung (32)

Stammlösung:	NaCl	80,00 g
	KCl	4,00 g
	$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,60 g
	KH_2PO_4	0,60 g
	$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	2,00 g
	$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	1,85 g
	Aqua bidest. ad	1000,0 ml

Diese Stammlösung wird vor Gebrauch mit bidestilliertem Wasser 1+9 verdünnt, darin Glucose 2,8 mM gelöst und anschließend der pH-Wert mit $NaHCO_3$-Lösung auf 7,35 eingestellt. Der Zusatz von Glucose soll die Energieversorgung der B-Zelle während des Isolierungsprozesses sicherstellen.

2.5.2. Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung (KRB-Lösung)

Umbreit et al. gibt zur Bereitung der KRB-Lösung folgende Zusammensetzung an : (33)

NaCl -Lösung	0,90% = 154 mM	100 Teile
KCl -Lösung	1,15% = 154 mM	4 Teile
$CaCl_2$ -Lösung	1,22% = 110 mM	3 Teile
KH_2PO_4-Lösung	2,11% = 154 mM	1 Teil
$MgSO_4$ -Lösung	3,82% = 154 mM	1 Teil
$NaHCO_3$-Lösung	1,30% = 154 mM	21 Teile

Um diese Lösung jederzeit frisch herstellen zu können wird sie in drei voneinander getrennten Stammlösungen folgender Zusammensetzung aufbewahrt.

Lösung A :	NaCl		59,20 g
	KCl		3,61 g
	KH_2PO_4		1,62 g
	$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$		2,93 g
	Aqua bidest.	ad	1000,0 ml
Lösung B :	$NaHCO_3$		21,10 g
	Aqua bidest.	ad	1000,0 ml
Lösung C :	$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$		3,73 g
	Aqua bidest.	ad	1000,0 ml

Zum Gebrauch werden diese Stammlösungen wie folgt gemischt:

Lösung A :	1 Teil
Lösung B :	1 Teil
Lösung C :	1 Teil
Aqua bidest.	7 Teile

Die Mischung wird auf pH 7,0 eingestellt, fünf Minuten lang mit Carbogen (95% O_2 + 5% CO_2) begast und anschließend mit Rinderserumalbumin versetzt.

2.6 Inkubationslösungen

2.6.1 Vorinkubationslösung

Die Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung wird mit 3,3 mM Glucose versetzt, der pH-Wert auf 7,0 eingestellt und anschließend 10-15 Minuten lang mit Carbogen begast. In 5,00 ml dieser Lösung werden 100 mg Rinderserumalbumin (2000 mg% Albumin) gelöst, der pH-Wert auf 7,35 eingestellt und 2 ml zur Vorinkubation der Inseln verwendet.

2.6.2 Hauptinkubationslösung

Zur Hauptinkubation ist die KRB-Lösung aus praktischen Erwägungen doppelt-konzentriert herzustellen.

Lösung A :	2 Teile
Lösung B :	2 Teile
Lösung C :	2 Teile
Aqua bidest.	4 Teile

Dann wird die KRB-Lösung auf pH 7,0 eingestellt, anschließend 10-15 Minuten lang mit Carbogen begast und mit Rinderserumalbumin (4000 mg%) versetzt. Jetzt wird der pH-Wert auf 7,35 eingestellt und die Lösung in zwei Hälften geteilt. In der einen Hälfte werden 33,3 mM Glucose gelöst und durch Verdünnen mit der anderen Hälfte die gewünschten Glucosekonzentrationen hergestellt (22,2 mM und 11,1 mM Glucose). Bei der Durchführung des Versuches werden 0,5 ml dieser Hauptinkubationslösung mit 0,5 ml der wäßrigen radioaktiven Glucoselösung versetzt, so daß eine Inkubationslösung in der üblichen Zusammensetzung erhalten wird (Endkonzentration 2% Gew/ Vol bzw 2000 mg%).

2.7 Versuchstiere

Zur Verwendung gelangen ausschließlich Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts, bei erwachsenen Tieren zur PPS-Bestimmung jedoch nur Weibchen (jeweils die Muttertiere der Föten bzw. Neugeborene) mit einem Gewicht von 220-260 g. Die Haltung erfolgt in Makrolonkäfigen bei einer Raumtemperatur zwischen 24°C und 26°C und 55-65% relativer Luftfeuchte unter Einhaltung eines 12-Stunden Tag/Nacht-Rhythmus. Sie erhalten Standardtrockenfutter der Firma Altromin ^{R}, Lage/Lippe und Trinkwasser ad libitum.

2.7.1 Fötale Ratten

Die Zucht wird nach der intermittierend monogamen Methode (34) durchgeführt, bei der die Verpaarung im Verhältnis 1:1 vollzogen wird, also nur je ein männliches und ein weibliches Tier zusammengesetzt werden. Die Tiere, die zur Verpaarung kommen, müssen folgende Bedingungen erfüllen :

Weibliche Tiere müssen mindestens 63 Tage alt sein und 180 - 220 g wiegen.

Männliche Tiere dürfen maximal 70 Tage alt sein und 240 - 280 g wiegen.

Der Altersunterschied vom Männchen zum Weibchen soll

21 Tage nicht überschreiten. Keinesfalls soll das weibliche Tier am Tage der Verpaarung schwerer sein als das männliche.

Der Brunstzyklus der Ratten umfaßt im Normalfall 4-5 Tage, wovon nur zwei Tage auf die Brunst entfallen.
Brunstzyklus:

12 Stunden Vorbrunst (Proöstrus)
10 - 18 Stunden eigentliche Brunst (Östrus)
24 - 30 Stunden Abklingen der Brunst (Metöstrus)
50 - 60 Stunden Ruhestadium zwischen zwei Brunstäußerungen (Diöstrus)

Durch verschiedene Einflüsse kann der Brunstzyklus verändert werden. So sind Zyklusverschiebungen möglich, wenn das Weibchen zum Männchen gesetzt wird, das Raumklima verändert wird oder durch andere äußere Einflüsse. Aus den genannten Gründen ist es also schwierig vorauszusagen wann ein Zusammensetzen von weiblichen und männlichen Tieren zur Schwangerschaft führt. Dies ist aber unbedingt erforderlich, weil man wissen möchte, an welchem Wochentag wieviel trächtige Ratten den 21.Tag p.c. erreichen. Die Begattung kann als erfolgreich angesehen werden, wenn sich 3-8 Stunden nach ihr ein Vaginalpfropf bildet. Die Trächtigkeit der Ratte schwankt zwischen 21 und 24 Tagen. Für den Original-Wistar-Stamm beträgt sie 22 Tage 14 Stunden und 30 Minuten. Um den Zeitpunkt der Konzeption auf

6-10 Stunden genau zu ermitteln und am gewünschten Tage genügend trächtige Ratten zu erhalten, gehen wir wie folgt vor:

Nachmittags werden 6-12 Rattenpaare zusammengesetzt. Die Begattung erfolgt meist in den frühen Morgenstunden (3^{oo}). Am folgenden Vormittag wird das Männchen entfernt und nach dem Vaginalpfropf gesucht. Um diesen leicht zu finden werden die Tiere in den Makrolonkäfigen auf Drahtgitter gesetzt, unter denen weißes Papier liegt. So ist der gelblich- rote Vaginalpfropf leicht zu erkennen. Mit ca. 97% Wahrscheinlichkeit ist nach der Vaginalpfropfbildung mit einer Schwangerschaft zu rechnen. Der Tag, an dem der Vaginalpfropf gefunden wird, zählt als Tag 1 p.c. und am Tag 22 p.c. erfolgt die Schnittentbindung zur Gewinnung der Föten. Für unsere Bedürfnisse hat sich diese Methode als hinreichend genau bewährt.

2.7.2 Neugeborene Ratten

Zur Gewinnung neugeborener Ratten verfährt man wie oben angegeben, nur läßt man die trächtigen Ratten natürlich austragen und notiert den Tag der Geburt. Zu kleine Würfe (weniger als fünf Jungtiere) werden nicht zu Versuchen herangezogen. Das Geburtsgewicht der Ratte beträgt 4-5 g, Männchen sind meist etwas schwerer als Weibchen.

Für Wistar-Ratten sind folgende Geburtsgewichte ermittelt worden (Thomae (34)):

Männchen 4,41 - 4,71 Gramm
Weibchen 4,12 - 4,31 Gramm

Die eben geborenen Rattenjungen sind erst rot, später rosafarben und vollkommen haarlos. Die Ohren und Augen sind geschlossen. Nach dem 3.-4. Tage öffnen sich die Ohren. Nach fünf Tagen wiegen die Jungen schon um die zehn Gramm. Die laktierende Ratte benötigt wesentlich mehr Futter pro Tag. Der Verbrauch steigt von etwa 25 g/Tag auf 40-70 g/Tag.

2.7.3 Erwachsene Ratten

Es werden jeweils die Mütter der entsprechenden Jungtiere am selben Tage zum Versuch herangezogen.

2.8 Isolierung Langerhansscher Inseln nach Lacy und Kostianovsky (35)

2.8.1 Erwachsene Ratten

Die Ratten werden mit Äther narkotisiert. Das Abdomen wird durch einen Längsschnitt bis zum Brustbein und je zwei Querschnitte unterhalb der Rippenbögen und rechts und links zum Becken hin eröffnet. Das Duodenum wird mit einer Pinzette unter dem Leberlappen hervorgezogen, um den Ductus pancreaticus sichtbar zu machen. Kurz nach der Endigung des Magens in das Duodenum führt der Ductus pancreaticus, von der Leber kommend, in den oberen Teil des Dünndarms. Diese Stelle ist zur Injektion in den Ductus pancreaticus günstig, da dieser hier in seinem Querschnitt etwas vergrößert ist. Der Ductus pancreaticus wird möglichst weit in Richtung Leber mit einem Faden abgebunden. Nach Abklemmen des Duodenums zum Magen hin, injiziert man langsam und vorsichtig ca. 10 ml Hanks' Lösung in den Ductus pancreaticus. Das Pankreas bläht sich bis zur Milz hin auf und wird nun sehr gut sichtbar. Es läßt sich behutsam von Milz, Leber, Magen und Darm mit Hilfe einer kleinen Schere abtrennen und wird sofort in einer gekühlten Petrischale mit eiskalter Hanks' Lösung von Blut und dann von anhängendem Fettgewebe befreit. Das Fett ist von weißlicher Farbe, im Gegensatz zum gelblichen Pankreasgewebe und reflektiert das Licht, wodurch

es zweifelsfrei auszumachen ist. Anschließend wird die überstehende Hanks' Lösung abgesaugt und dann das Pankreas möglichst gleichmäßig mit einer Schere zerkleinert (ca. 10 Minuten), bis es durch den Konus einer 5ml-Spritze aufgesaugt werden kann. Mit Hanks' Lösung wird das Volumen in der Spritze auf 5ml ergänzt und die Spritze auf dem Kopf ca. 3-5 Minuten in Eis gestellt. Der wäßrige, trübe Überstand wird dekantiert und das zerkleinerte Pankreas in ein 20 ml-Schnappdeckelglas, in dem sich 5 mg Collagenase befindet, injiziert. Bei 37°C wird das verschlossene Gläschen in einem thermostatierten Wasserbad so lange geschüttelt, bis eine homogene hellbraune, schleimige Flüssigkeit entsteht. Dies dauert je nach Verdünnung, Aktivität der Collagenase und der Größe der Pankreaspartikel 8-12 Minuten. In dieser Zeit wird das exokrine Gewebe durch Collagenase verdaut bzw. angedaut und so von den Langerhansschen Inseln getrennt. Wird der Verdauungsvorgang nicht rechtzeitig abgebrochen, so werden auch die Langerhansschen Inseln angegriffen. Der Verdauungsvorgang wird gestoppt, indem der Inhalt in ein kleines, mit wenig eisgekühlter Hanks' gefülltes Becherglas überführt wird. Zur besseren Trennung von exokrinem und endokrinem Gewebe, zieht man dann die Flüssigkeit dreimal in die Spritze auf und spritzt den Inhalt durch ein feines Plastiksieb in einen ebenfalls mit eisgekühlter Hanks' Lösung gefüllten 25 ml-Meßzylinder, der im Eisbad steht. Der Becher wird noch mehrmals mit Hanks' Lösung

gespült und der Inhalt jeweils durch das Sieb gespritzt, bis der Zylinder gefüllt ist. Durch die starke Verdünnung der Collagenasekonzentration und die starke Abkühlung im Eisbad verliert die Collagenase an Aktivität und kann somit die Inseln nicht mehr schädigen. Im Meßzylinder setzen sich die aufgewirbelten Partikel durch ihr unterschiedliches spezifisches Gewicht verschieden schnell ab. Die Sedimentationsgeschwindigkeit ist für Langerhanssche Inseln mit am größten. So ist es durch mehrmaliges Absaugen des Überstandes und erneutes Aufschwemmen möglich, exokrine Partikel und Langerhanssche Inseln zu trennen. Dieser Vorgang wird ca. 8 mal wiederholt, bis die überstehende Flüssigkeit weitgehend klar erscheint. Die Inseln, am Grunde des Meßzylinders liegend, können dann in kleine Petrischalen überführt werden, aus denen man sie mit Hilfe einer Mikropipette unter dem Stereomikroskop aussortiert. Alle beschriebenen Vorgänge erfolgen unter Eiskühlung bei $0^{o}C$.

2.8.2 Fötale Ratten (21. Tag p.c.)

Eine trächtige Ratte wird mit Äther narkotisiert und das Abdomen durch einen Längsschnitt bis zum Brustbein und je zwei Querschnitte in Becken- und Rückenhöhe eröffnet. Man sieht die beiden Stränge des graviden Uterus, der in der Regel 8-12, manchmal bis zu 15 Föten enthält und bis zur Leber reicht. Jeder der Uterusstränge wird mit einer

kleinen, scharfen Schere eröffnet. Durch die rhythmische Kontraktion des Uterus bzw. auch der Föten können diese leicht herausgenommen werden. Sie sind noch durch die Nabelschnur mit der Plazenta verbunden. Nach Durchtrennen der Nabelschnur wird der Föt gewogen (mindestens 4,3 g) und sofort dekapitiert. Dann wird der Föt auf die rechte Seite gelegt und mit einem Querschnitt unterhalb des Magens das Abdomen eröffnet. Mit Zeigefinger und Daumen wird unter leichtem Druck die Schnittfläche auseinander gespreizt. Dadurch quillt der Magen hervor und legt das Pankreas frei, das als weißlich glänzendes Gewebe gut zu sehen ist. Mit etwas Geschick wird das Pankreas jetzt vorsichtig in eine solche Lage gebracht, daß es mit einer stumpfen Pinzette, von der Milz ausgehend, vom anhaftenden Gewebe entfernt werden kann. Mitgerissenes Gewebe, insbesondere blutende Teile von Milz oder Leber, kann auf einem Stück Filterpapier vom fötalen Pankreas getrennt werden. Das Pankreas wird dann sofort in eine mit eisgekühlter Hanks' Lösung gefüllte Petrischale überführt. In einigen wenigen Fällen zerreißt der Magen oder der Darm bei der Exstirpation des Pankreas. Es ist unbedingt darauf zu achten, daß die austretende, enzymreiche Flüssigkeit nicht mit dem Pankreasgewebe in Berührung kommt. Andernfalls ist das Gewebe zu verwerfen, da Andauungsprozesse und pH-Verschiebungen nicht ausgeschlossen werden können. Auf diese Weise werden auch aus den restlichen Föten die Pankreata isoliert und im Pool auf-

bewahrt. Bei Föten unter 4,3 g Gewicht ist die Inselausbeute nicht lohnend. Häufig ist die Mutter nach dem Eingriff noch vital, so daß auch bei ihr das Pankreas entfernt werden kann.

Die gesammelten Pankreata werden anschließend trockengesaugt und dann mit der Schere ca. 5 Minuten lang zerschnitten. Dann werden die Partikel mit 5 ml Hanks' Lösung in eine Spritze aufgezogen und diese umgekehrt für drei Minuten in Eis gestellt. Sodann wird der Überstand abgespritzt bis das Volumen in der Spritze 2 ml beträgt. In einem 20 ml Schnappdeckelglas mit 5 mg Collagenase wird das Pankreasgewebe bei 37°C in einem Schüttelbad so lange belassen, bis der Inhalt homogen erscheint (ca 10 Minuten). Der Inhalt wird in ein Becherglas gegossen und wie bei den erwachsenen Ratten beschrieben, weiter isoliert.

2.8.3 Neugeborene Ratten (5.Tag p.p.)

Am fünften Tage nach der Geburt werden die neugeborenen Ratten (Gewicht ca. 10 g) kurz mit Äther narkotisiert, dekapitiert und wie die Föten auf die rechte Seite gelegt. Bei Neugeborenen ist der Magen meist mit Milch gefüllt, so daß er schon von außen deutlich an der weißen Farbe erkennbar ist. Durch einen Querschnitt unterhalb des Magens wird die Bauchdecke eröffnet und der Schnitt mit dem

Daumen und Zeigefinger gespreizt. Vom hervortretenden weißen Magen ist das Pankreas jetzt schwerer abzugrenzen als bei den Föten und es wird dann genauso wie im Kapitel 2.8.2 beschrieben, weiter verarbeitet.
Inseln von neugeborenen Ratten finden sich zahlreicher als fötale Inseln, sind in ihrer Inselstruktur deutlicher zu erkennen und insgesamt leichter zu isolieren.

2.9 Vorinkubation

Die Vorinkubation dient der Stoffwechselregeneration der Langerhansschen Inseln nach dem Isolierungsprozeß. Die in Hanks' Lösung isolierten und von jeglichem anderen Gewebe befreiten Inseln werden in ein schmales, hohes Gläschen (ca. 5 ml) eingebracht und die überstehende Hanks' Lösung möglichst weit abgesaugt. Anschließend werden 2 ml Vorinkubationslösung (pH 7,35) auf die Inseln pipettiert. Das Glas wird mit einem Gummistopfen verschlossen und 30 Minuten lang in einem thermostatierten Wasserbad bei 37°C (Frequenz : 72 Schläge/Min.) geschüttelt. Während dieser Zeit werden die Inseln mit Carbogen begast. Die Inseln werden danach dreimal mit eisgekühlter Hanks' Lösung gewaschen, in der sie bis zur Hauptinkubation auch aufbewahrt werden. Der pH-Wert von 7,35 sollte bei beiden Lösungen häufiger überprüft werden.

2.10 Hauptinkubation - Bestimmung der Aktivität des Pentosephosphatshunts (PPS)

Die Bestimmung der PPS-Aktivität nach der Methode von Katz und Wood (36) gliedert sich in drei Abschnitte :

1. THO - Bildung aus 5-^{3}H -Glucose
2. $^{14}CO_2$- Bildung aus 1-^{14}C-Glucose
3. $^{14}CO_2$- Bildung aus 6-^{14}C-Glucose

Die Bildung von $^{14}CO_2$ dient zur Bestimmung der Glucoseoxidation, die THO-Messung zur Bestimmung der Glucoseutilisation. In den folgenden Abschnitten werden das Prinzip der Bestimmungsmethoden und die wichtigen Reaktionsschritte der Glykolyse, des PPS und der THO-Abspaltung erläutert.

2.10.1 THO-Bildung aus 5-^{3}H-Glucose

Die Bestimmung erfaßt sowohl den Glucoseabbau über die Glykolyse, als auch über den Pentosephosphatshunt, nicht aber die Glykogenbildung. Nach Ashcroft et al. (10) beträgt in Mäuseinseln die Einbaurate von ^{3}H aus 5-^{3}H-Glucose in Glykogen lediglich weniger als 7% der Glucoseutilisation. In der Glykolyse erfolgt die Abspaltung des radioaktiv markierten Wasserstoffatoms am C-5 Atom der

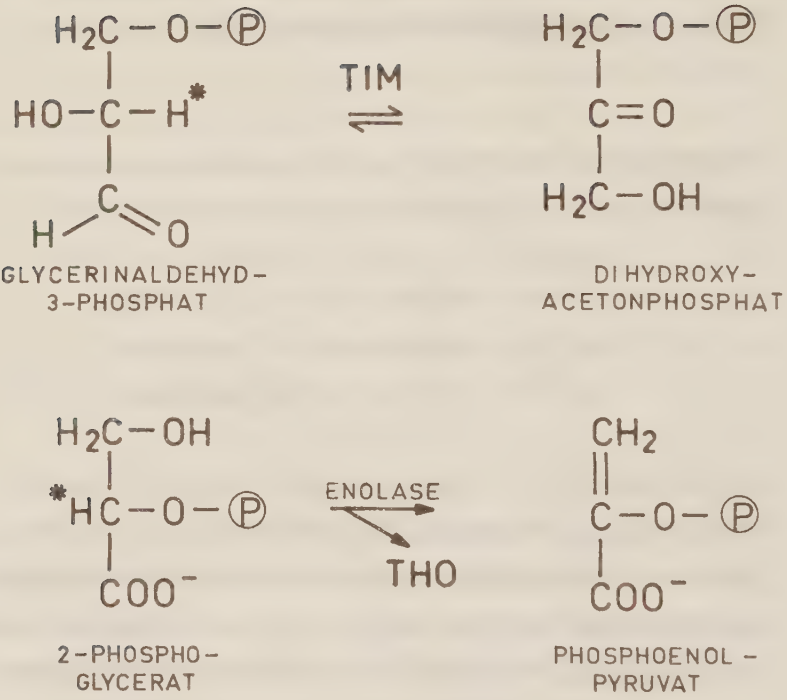


Abb.1

Glucose entweder bei der Triosephosphatisomerase-Reaktion (Abb.1) oder bei der Bildung von Phosphoenolpyruvat aus 2-Phosphoglycerat . Das bei der Reaktion freiwerdende Wasser enthält das Tritiumatom. Pro Molekül Glucose wird im glykolytischen Abbauweg ein Molekül THO gebildet.

Aber auch die Glucose, die über den Pentosephosphatshunt verstoffwechselt wird, durchläuft die obigen Reaktions-

schritte, weil die Endprodukte, Glycerinaldehyd-3-phosphat und Fructose-6-phosphat, der Glykolyse zugeführt werden. Beide Reaktionsprodukte enthalten die C-Atome in 4, 5 und 6-Stellung der eingesetzten Glucose, so daß bei der Freisetzung von THO wieder das am C-5 Atom der Glucose radioaktiv markierte Wasserstoffatom erfaßt wird, das den Abbauweg über den PPS durchlaufen hat. Quantitativ wird auch im Abbau über den PPS aus einem Molekül Glucose nur ein Molekül THO gebildet, weil aus einem Molekül Glucose entweder nur Glycerinaldehyd-3-phosphat oder nur Fructose-6-phosphat gebildet werden kann.

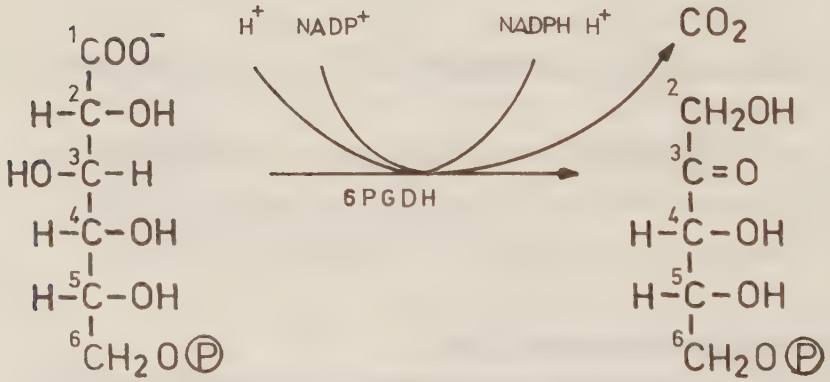
2.10.2 $^{14}CO_2$- Bildung aus 1-^{14}C- und 6-^{14}C-Glucose

Durch den Einsatz von 6-^{14}C-Glucose wird der Anteil der Glykolyse, durch 1-^{14}C-Glucose der Anteil der Glykolyse und des PPS an der Glucoseoxidation gemessen.

Pentosephosphatshunt, PPS:

In allen Organen außer der Leber wird Glucose durch die Hexokinase unter ATP-Verbrauch zu Glucose-6-phosphat und ADP umgesetzt. Der erste Schritt des Abbauweges im PPS ist die Oxidation von Glucose-6-phosphat zu 6-Phosphogluconolacton durch die NADPH-abhängige Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (Abb.2). Durch die 6-Phosphoglucono-lactonase wird das Lacton zu 6-Phosphogluconat hydroly-

siert, welches dann im zweiten Schritt durch 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase zu Ribulose-5-phosphat, CO_2 und NADPH decarboxyliert wird. Dabei wird das 1-^{14}C-Atom des 6-Phosphogluconats als $^{14}CO_2$ entfernt und der entstehende Wasserstoff auf NADP übertragen. Dies ist der entscheidende Reaktionsschritt im PPS bei Verwendung von C-1 markierter Glucose. Über weitere Abbauschritte werden schließlich zum Teil Zwischenprodukte der Glykolyse, wie Glycerinaldehyd-3-phosphat und Fructose-6-phosphat gebildet.



6PGDH = 6-PHOSPHOGLUCONAT - DEHYDROGENASE

Abb.2

Glykolyse:

Durchläuft ein am C-6 Atom markiertes Glucosemolekül den PPS, so wird es als Glycerinaldehyd-3-phosphat bzw. Fructose-6-phosphat weiter metabolisiert, ohne daß es zu einer Abspaltung des 6-^{14}C-Atoms im PPS kommt. Die Glucose kann aber auch direkt über den glykolytischen Abbauweg verstoffwechselt werden. Aus 6-^{14}C markierter Glucose freigesetztes $^{14}CO_2$ kann daher sowohl den PPS als auch die Glykolyse durchlaufen haben. Nach Bildung von Fructose-1,6-diphosphat erfolgt die Spaltung in Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat. Ab hier durchlaufen die C-Atome 1 und 6 der eingesetzten Glucose die gleichen Abbauschritte, folglich kann auch nicht mehr zwischen C-1 und C-6 markierten Kohlenstoffatomen unterschieden werden. Obwohl das Gleichgewicht zwischen diesen beiden Produkten zugunsten des Dihydroxyacetonphosphats verschoben ist, wird nur Glycerinaldehyd-3-phosphat im Glucoseabbau weiter metabolisiert. Aus nur einem Molekül Glucose entstehen also zwei Moleküle Glycerinaldehyd-3-phosphat. An dieser Stelle wird auch das Glycerinaldehyd-3-phosphat aus dem PPS eingeschleust. Über mehrere Zwischenschritte ensteht schließlich Pyruvat, das in seiner Methylgruppe entweder das markierte C-1 oder das C-6 Atom der eingesetzten Glucose enthält. Pyruvat wird durch die Pyruvat-Dehydrogenase in Acetyl-CoA und CO_2 decarboxyliert. Die Reaktion ist irreversibel. Über das Acetyl-CoA gelangen das C-1 oder das C-6 Atom der Glucose in den Zitronensäurezyklus und werden dort, entweder beim Reaktionsschritt vom

Isocitrat zum α-Ketoglutarat oder bei der Bildung von Succinyl-CoA aus α-Ketoglutarat, als CO_2 abgespalten. Das Pyruvat, das im Zitronensäurezyklus weiter oxidiert wird, stammt also entweder aus Glucose, die von Anfang an über die Glykolyse abgebaut wird, oder aber aus Glucose, die den PPS durchlaufen hat und dann ohne das ursprünglich markierte C-1 Atom, als Glycerinaldehyd-3-phosphat oder Fructose-6-phosphat in die Glykolyse eingeschleust worden ist. Diese Verzahnung der beiden Abbauwege muß bei der Berechnung der Glucoseoxidation berücksichtigt werden.

2.10.3 Quenchkurven

Prinzip der LSC-Technik:

Der LSC ist besonders für weiche ß-Strahler z.B. ^{3}H und ^{14}C geeignet, deren Energie zwischen 10 KeV und 1500 KeV liegt. Beim ß-Zerfall entstehen Elektronen mit einer kontinuierlichen Energieverteilung von Null bis E_{max}. Die Umwandlung dieser Zerfallsenergie in Photonen ereignet sich in Lösungsmittel-Szintillator-Gemischen, die eine optimale Energieübertragung zulassen. Als Lösungsmittel ist Toluol oder Dioxan, als Szintillator PPO und POPOP geeignet. Als Lösungsvermittler dient Methanol. Löschsubstanzen (Quenchsubstanzen) beeinflussen negativ die Zählausbeute durch eine Linksverschiebung des Energiespektrums, was

einen Verlust an Strahlungsenergie zur Folge hat. Solche Substanzen sind z.B. alkalische Medien, Radikalbildner, Säuren, Salze, Albumin und Peroxyde.

Die emittierten Photonen werden von zwei Photomultipliern gemessen, die das Zählrohr umschließen und die nur gleichzeitig beobachtete Lichtblitze (Koinzidenz) registrieren. Durch Pulssummation, Verstärkung der Impulse und Impulshöhenanalyse ist die Erfassung eines bestimmten Nuklids möglich. Die Ergebnisse werden als cpm angezeigt. Es sind aber nur die tatsächlichen Zerfälle pro Minute (dpm) von Bedeutung, denn die vom Schreiber des LSC-Gerätes ausgedruckten Aktivitäten der Proben sind nicht direkt verwertbar, weil ein beträchtlicher Teil der eingesetzten Radioaktivität nicht erfaßt wird. Diesen Schwund bezeichnet man als Quench und er muß bei der Berechnung der Meßwerte berücksichtigt werden. Daher ist der Löscheffekt in der jeweiligen Probe zu bestimmen. Diese Quenchkorrektur erfolgt mit der Externen-Standard-Kanalverhältnismethode. Dazu wird jede Probe im Flüssig-Szintillations-Zähler gegen den externen Standard Barium 133 (y-Strahler) verglichen. Der dabei ermittelte Wert des externen Standards = ESR (external standard ratio) ist ein indirektes Maß für den Quencheffekt der Probe. Die Quench-Unterschiede kommen durch minimale Differenzen in den Volumina des zugesetzten Wassers bzw. Hyamins^{R} und im Zusatz von KRB-Albuminlösung und N-HCl zustande.

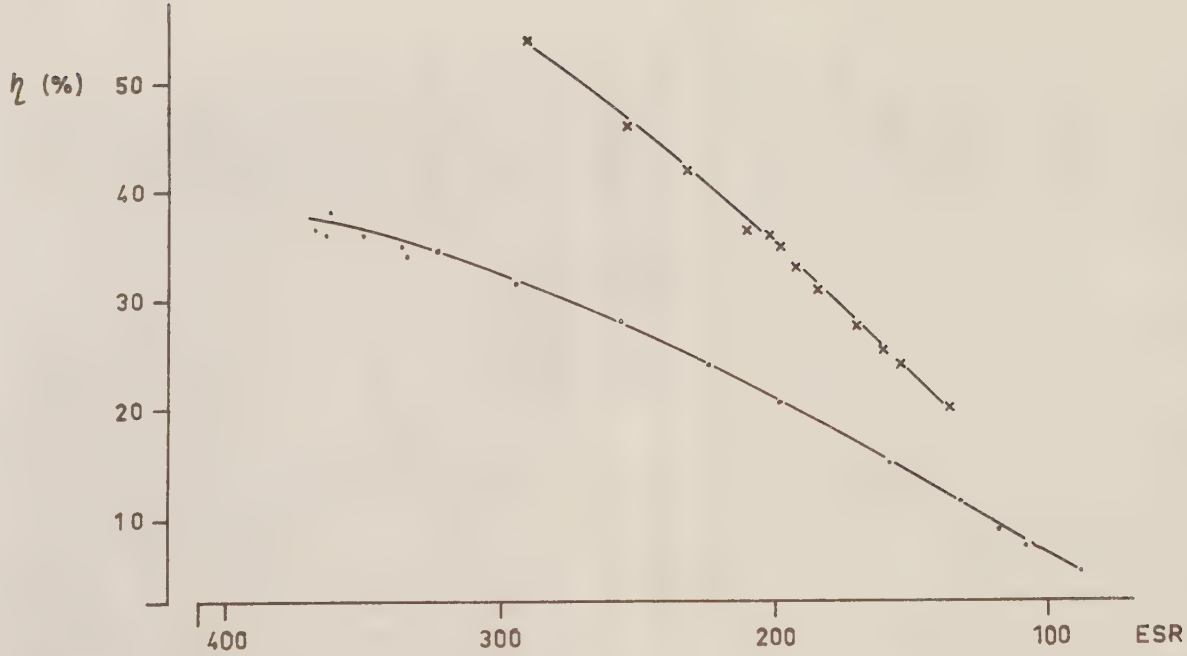


Abb.3: QUENCHKURVEN für ^{3}H

Abhängigkeit des externen Standards (ESR) vom Löscheffekt in der Probe, berechnet als % η = "efficiency".

Die mit (–x–x–) bezeichnete Kurve gilt für den Löscheffekt im äußeren Gefäß (THO Probe), die mit (–•–•–) bezeichnete Kurve für den Löscheffekt im inneren Gefäß (Absolutwert), d.h. bei der 5-^{3}H-Glucoselösung.

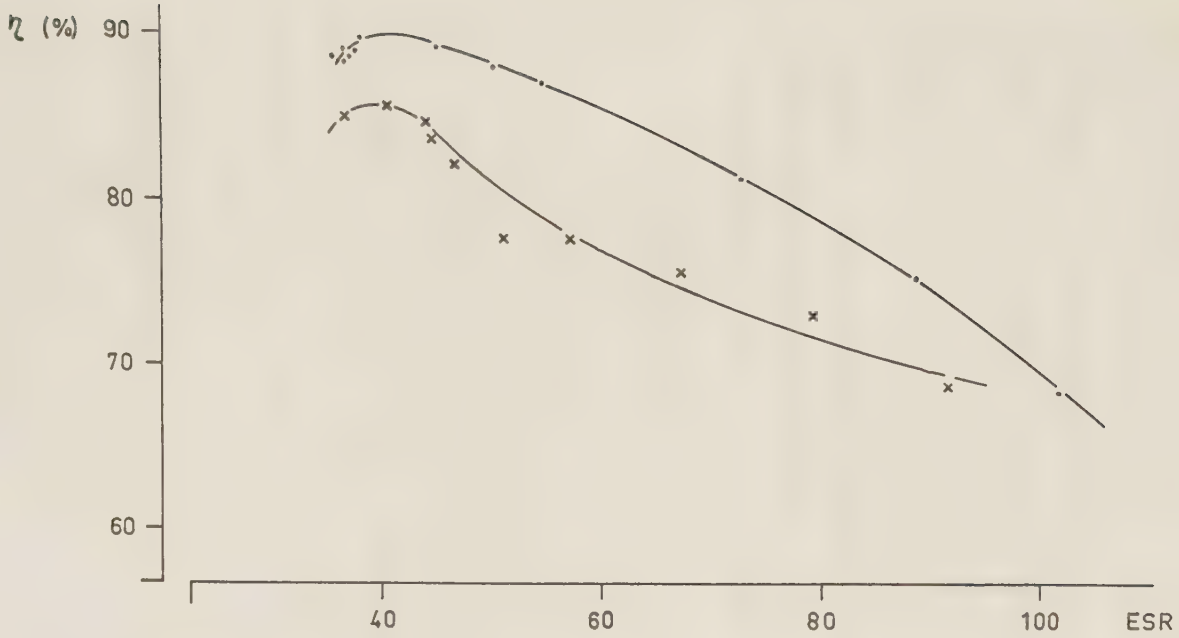


Abb.4: QUENCHKURVEN für ^{14}C

Abhängigkeit des externen Standards (ESR) vom Löscheffekt in der Probe, berechnet als % η = "efficiency".

Die mit (—x—x—) bezeichnete Kurve gilt für den Löscheffekt im äußeren Gefäß ($^{14}CO_2$ Probe), die mit (—·—·—) bezeichnete Kurve für den Löscheffekt im inneren Gefäß (Absolutwert), d.h. bei der 1-^{14}C- bzw. der 6-^{14}C-Glucoselösung.

Durchführung:

Für die ^{3}H und die ^{14}C-Messung müssen jeweils zwei Quenchkurven aufgestellt werden (siehe Abb. 3 und 4). Die erste Quenchkurve gibt den Quench im äußeren Glas = Szintillationsglas (s. Abb.5 Seite 46) wieder. 10 ml Szintillationslösung auf Dioxan- oder Toluolbasis werden zu 0 bis 5 ml Wasser bzw. Hyaminhydroxid zugesetzt und die Aktivität dieser Proben im LSC gemessen.

Mit der zweiten Quenchkurve ist der Quench im inneren Glas = Absolutwert dargestellt. 10 ml Szintillationslösung (Bray) werden zu 0 bis 5 ml der KRB-Albuminlösung (2000 mg% Albumin; 5,6 bzw. 16,7 mM Glucose; 10% HCl-Zusatz) hinzu pipettiert (= Inkubationsmedium). Dann wird die Aktivität der Proben im LSC gemessen.

Für Tritium werden die Quenchkurven mittels eines Tritiumstandards bestimmt, dessen Aktivität 1 mCi/ml beträgt. Je Probe werden 50 µl des verdünnten, wäßrigen Standards eingesetzt, dies entspricht 0,2 nCi = 444 dpm (äußeres Gefäß) bzw. 0,5 µCi = 1 110000 dpm (inneres Gefäß).

Für die Quenchkurve der ^{14}C-Messung wird ein ^{14}C-Standard verwendet, dessen Aktivität 250 µCi/1,25 ml beträgt. Je Probe werden 50 µl der verdünnten Lösung verwendet, entsprechend 0,025 µCi = 55 500 dpm (äußeres Gefäß) bzw. 0,05 µCi = 111 000 dpm (inneres Gefäß).

Berechnung der Quenchkurven:

Die ausgedruckten Aktivitäten der Proben werden dividiert durch die oben errechneten tatsächlichen Aktivitäten und der Quotient multipliziert mit 100 als $\%\eta$ = "efficiency" angegeben. In einem Koordinatensystem wird die ESR (Abzisse) und die dazugehörende "efficiency" (Ordinate) aufgetragen. So kann jeder Probe auf Grund des ESR-Wertes die entsprechende "efficiency" zugeordnet werden. Die im Kanal gezählten Zerfälle werden nach folgender Formel in dpm umgerechnet:

$$dpm = \frac{cpm}{\%\eta} \times 100$$

Die Kurve —x—x— zeigt die Verhältnisse im äußeren Szintillationsglas, die Kurve —•—•— im inneren Glas (Absolutwert). Wie aus den Kurven ersichtlich, ist der Löscheffekt der Proben beträchtlich. Unter den Versuchsbedingungen beträgt er bei ^{3}H-Glucose ca. 60-65% und bei ^{14}C-Glucose ca. 10-15%.

2.10.4 Glucosereinigung:

Um bei der LSC-Technik zu verwertbaren Aussagen zu kommen, muß eine hinreichend hohe Zahl von radioaktiv mar-

kierten Glucosemolekülen von den Inseln verstoffwechselt werden, damit genügend radioaktives CO_2 für die Messung zur Verfügung steht. Die $^{14}CO_2$-Umsatzrate der Inseln sollte möglichst doppelt so groß sein wie die 'vorgetäuschte' $^{14}CO_2$-Umsatzrate eines entsprechenden Leerwertes (ohne Inseln). In Vorversuchen ist zu klären wieviel radioaktives CO_2 bzw. THO vom Gerät registriert werden, ohne daß Inseln im Versuch eingesetzt werden (sogenannte Blanks bzw. Backgrounds). Setzt man saubere Szintillationsgläschen in den Counter, so zeigt der Rechner immerhin zwischen 10-20 cpm ^{14}C an. Setzen wir radioaktiv markierte Glucose unter Versuchsbedingungen, aber ohne Inseln (Blanks) ein, so liegt der ^{14}C-Meßwert so hoch, daß die ^{14}C-Meßwerte, die real von den Inseln produziert werden, innerhalb der Streuung dieser Background-Werte liegen. Die Background-Werte sind also gleich hoch oder sogar höher als die eigentlichen Versuchswerte (mit Inseln), was darauf hindeutet, daß die radioaktiv markierte Glucose wenig stabil und zum Teil zersetzt ist. In der praktischen Durchführung kann sich dies durch negative Umsatzraten der Inseln an ^{14}C- und ^{3}H-Glucose bemerkbar machen. Abhilfe verspricht eine drastische Erhöhung des Inselmaterials pro Versuchsansatz, was aber aus Gründen des Versuchsaufbaues nicht möglich gewesen ist. Ein anderer Weg, die unerwünschte Glucosezersetzung auf ein vertret-

bares Maß zu reduzieren, ist die Reinigung der radioaktiven Glucose von flüchtigen radioaktiven Bestandteilen durch Gefriertrocknung. Dazu entnimmt man der Originallösung von Amersham die für einen Versuchsansatz benötigte Menge und verdünnt in einem Plastikszintillationsgefäß auf 0,6 bis 1,0 ml mit frischem bidestilliertem Wasser und gefriertrocknet ca. 2 Stunden lang. Nach der Gefriertrocknung wird die für den Versuch errechnete Menge Aqua bidestillata zugesetzt und die Glucoselösung möglichst umgehend verwendet. Durch diese Methode sinken die Background-Werte auf ca. 10% des ursprünglichen Betrages.
Die Zusammensetzung dieser Zersetzungsprodukte ist nicht bekannt. Möglicherweise handelt es sich um säureflüchtige Bestandteile. Die gelieferte Originallösung hat einen radiochemischen Reinheitsgrad von 99%. Es handelt sich bei der Verunreinigung aber vermutlich um CO_2 und THO. Die durch die Gefriertrocknung entweichende Radioaktivität ist so gering, daß eine Abnahme der ursprünglich eingesetzten Aktivität nicht beobachtet werden kann.

2.11 Berechnung des Pentosephosphatshunts (PPS)

Bevor man berechnet, in welchem Ausmaß der PPS an der Glucoseoxidation beteiligt ist, wird die Glucoseutili-

sation bestimmt, die sowohl den Glucoseabbau über den PPS als auch über die Glykolyse erfaßt. Die Methode wird in Anlehnung an die Arbeit von Ashcroft et al.(10) durchgeführt.

2.11.1 Berechnung der Glucoseutilisation

1. Geht man davon aus, daß nach 24-stündigem Stehen sich ein Gleichgewichtszustand an THO zwischen innerem und äußerem Gläschen eingestellt hat, so ist zu berücksichtigen, daß das Gesamtverteilungsvolumen 3,1 ml = 100% beträgt und in den im äußeren Glas befindlichen 2 ml Wasser bei der Messung nur 64,5% des gebildeten THO erfaßt werden. Die gemessenen Zerfälle pro Minute (cpm) THO sind deshalb mit 1,55 zu multiplizieren (3,1 : 2).

2. Die tatsächlichen Zerfälle pro Minute (dpm) erhält man dadurch, daß man zum jeweiligen ESR-Wert die entsprechende "efficiency" (% η) aus der Quenchkurve aufsucht und in folgende Formel einsetzt.

$$dpm = \frac{cpm \times 100}{\% \eta}$$

Bei den Absolutwerten (inneres Gläschen) ist außerdem

das Ergebnis noch mit 11 zu multiplizieren, weil nur 1/11 des Volumens zur Messung eingesetzt wird.

3. Die spezifische Aktivität der 5-^{3}H-Glucose berechnet sich durch Division der zuvor ermittelten Zerfälle pro Minute (dpm) der Absolutwerte, durch die Anzahl pmol der insgesamt eingesetzten Glucose im Medium.

4. Werden die Zerfälle an THO (dpm) dividiert durch die spezifische Aktivität der Glucose, so erhält man die pmol utilisierte Glucose.

$$\text{pmol utilisierte Glucose} = \frac{\text{dpm THO}}{\text{spez. Aktivität (dpm/pmol)}}$$

5. Die genauso berechneten Werte pmol utilisierter Glucose in Proben ohne Inseln (Backgrounds) werden jetzt von den Werten der Proben mit Inseln subtrahiert. Auf diese Weise werden 'vorgetäuschte' Umsatzraten an THO, die nicht von Langerhansschen Inseln verursacht werden, eliminiert. Diese 'vorgetäuschten' Umsatzraten sind auf nicht näher bekannte Verunreinigungen in der 5-^{3}H-Glucose zurückzuführen.

6. Die so erhaltenen Werte tatsächlich utilisierter Glucose werden auf Grund der in Kapitel 2.11.2 durchgeführten Ver-

suche mit dem Faktor 5,65 multipliziert. Das Produkt gibt die Anzahl pmol utilisierte Glucose pro 5 Inseln während 90 Minuten an.

2.11.2 THO - Recovery

Um zu prüfen in welchem Ausmaß nach 24 Stunden ein Ausgleich an THO zwischen innerem und äußeren Gläschen stattgefunden hat, werden Proben, die einen THO-Standard enthalten, den gleichen Bedingungen wie im Versuch ausgesetzt. Der THO-Standard hat eine Aktivität von 2,105 µCi/g entsprechend $4{,}6731 \times 10^6$ dpm/g. Je Probe werden 50 µl einer wäßrigen Verdünnung des Standards entsprechend 584 dpm THO eingesetzt. Diese werden zu 1 ml einer KRB-Albumin-Glucoselösung gegeben, die 20 µl Insulinantiserumverdünnung, aber keine Inseln enthält. Unter Versuchsbedingungen wird die Bestimmung zu Ende geführt und dann berechnet, wieviel THO aus dem Stielgläschen (s.Abb.5 Seite 46) in das Wasser des Szintillationsgläschens übergegangen ist. Als Leerwert (Background) dienen Szintillationsgläschen, die nur 10 ml Bray-Lösung, aber kein THO enthalten. Die Backgrounds (23-24 cpm) werden von den 'Insel' -Werten abgezogen und das Ergebnis mit dem Faktor 1,55 multipliziert (Verhältnis des Gesamtvolumens zum inneren Volumen: 3,1:2 ml = 1,55). Nach der Quenchkorrektur erhält man so die wirklichen Zerfälle (dpm) an

THO. Setzt man die erhaltenen dpm THO ins Verhältnis mit dem ursprünglich einpipettierten THO bekannter Aktivität, ergibt sich eine Wiederfindungsrate von nur 17,7% $\pm$ 0,64 (n = 26). Die bei der Utilisation erhaltenen Werte müssen deshalb um den Faktor 5,65 = $\frac{100}{17,7}$ korrigiert werden. Die im Vergleich zu Ashcroft (ca.75% Recovery,(10)) niedrige Recoveryrate ist auf die drastischen Volumen- und Dimensionsveränderungen des Inkubationsgläschens zurückzuführen, die der hier durchgeführten Bestimmung zu Grunde liegen. Eine Verbesserung der Wiederfindungsrate war unter den vorgegebenen Versuchsbedingungen nicht möglich.

2.11.3 Berechnung der Glucoseoxidation im PPS

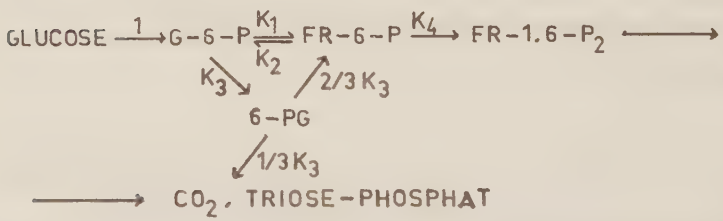
Die Berechnung des prozentualen Anteils des Pentosephosphatshunts an der Glucoseoxidation erfolgt nach der Veröffentlichung von Katz und Wood (37). Auf Grund der engen Verknüpfung der verschiedenen Glucoseabbauwege wird die Berechnung erschwert.

So wird im PPS ein Teil des gebildeten Fructose-6-phosphats nicht glykolytisch weiter verstoffwechselt, sondern in Glucose-6-phosphat zurückgebildet, welches den PPS erneut durchlaufen kann.

Glucose kann auch über Non-Triosephosphat-Pathways abgebaut werden. (Bildung von Glykogen, Lactose, Glucose, Glucoronide)

Die Oxidation von Triosephosphaten zu CO_2 ist unvollständig.

Der Glucoseabbau im PPS läßt sich wie folgt vereinfacht formulieren (37):



K_1 und K_2 sind die Raten der reversiblen Isomerisierung und K_4 stellt die Rate der Phosphorylierung von Fructose-6-phosphat zu Fructose-1,6-diphosphat dar. K_3 gibt die Rate der Oxidation von Glucose-6-phosphat zu 6-Phosphogluconat an. Im Gleichgewichtszustand gilt:

Glucose-Einstrom = Glucose-Ausstrom = 1

$$1 = 1/3K_3 + K_4 = PPS + EMP$$

Weiterhin sind bei der Berechnung des PPS folgende Punkte zu berücksichtigen:

1. Wie weiter oben schon aufgeführt, erfährt das Fructose-6-phosphat ein Recycling und wird erneut als Glucose-6-phosphat dem PPS bzw. der Glykolyse zugeführt (Hexosephosphatpool). Bei Verwendung von 1-^{14}C-Glucose fehlt aber dem neugebildeten Glucose-6-phosphat ein markiertes C-1 Atom, weil dieses beim ersten Abbau im PPS als $^{14}CO_2$ abgespalten wurde. So wird die ^{14}C-Konzentration des Hexosephosphatpools laufend verdünnt. Bei Verwendung von 6-^{14}C-Glucose tritt ein solcher Verdünnungsprozeß nicht ein, weil das markierte C-6 Atom im PPS nicht abgespalten wird und somit erneut dem Hexosephosphatpool zugeführt wird. Dieses unterschiedliche Verhalten des 6-^{14}C- und 1-^{14}C-Atoms wird rechnerisch durch Einführung des Begriffes spezifische Aktivität (dpm/pmol) berücksichtigt:

   α_1 = spez. Aktivität des Hexosephosphats bei Verwendung von 1-^{14}C-Glucose

   α_6 = spez. Aktivität des Hexosephosphats bei Verwendung von 6-^{14}C-Glucose

   Für den Ausstrom der Glucose gilt:

   Ausstrom 1-^{14}C-Glucose = (1 + 2 PPS) x α_1

   Ausstrom 6-^{14}C-Glucose = α_6

2. Die Glucoseutilisation wird durch die Einführung des Begriffes 'specific yield' (sy) berücksichtigt. Dies ist der Quotient aus oxidierter Glucose durch Glucoseutilisation. Voraussetzung für die Genauigkeit des Er-

gebnisses ist, daß Glucose praktisch nicht über Non-Triosephosphat-Pathways verstoffwechselt wird. Diese Bedingung ist nach Befunden von Ashcroft et al. (10) erfüllt.

Unter all diesen Voraussetzungen gilt folgende Formel für die Berechnung des prozentualen Anteils des PPS an der Glucoseoxidation:

$$\frac{sy\ (C\text{-}1) - sy\ (C\text{-}6)}{1 - sy\ (C\text{-}6)} = \frac{3\ PPS}{1 + 2\ PPS}$$

sy (C-1) = specific yield aus Oxidation der 1-^{14}C-Glucose

$$= \frac{\text{pmol oxid. 1-}^{14}\text{C-Glucose}}{\text{pmol util. Glucose}}$$

sy (C-6) = specific yield aus Oxidation der 6-^{14}Glucose

$$= \frac{\text{pmol oxid. 6-}^{14}\text{C-Glucose}}{\text{pmol util. Glucose}}$$

PPS = Teil der utilisierten Glucose, der über den PPS läuft.

2.11.4 Durchführung der Berechnung

1. Aus der Quenchkurve wird für jede Probe mittels der ausgedruckten externen standard ratio die efficiency = Zählausbeute in % = %η abgelesen.

2. Der Meßwert (cpm) wird mit 100 multipliziert und dann durch die %η dividiert. Das Ergebnis gibt die tatsächlichen Zerfälle pro Minute (dpm) an. Außerdem ist bei allen Meßwerten für das innere Glas der Meßwert zuvor mit elf zu multiplizieren, weil nur der elfte Teil des tatsächlichen Volumens der Probe zur Messung eingebracht wird.

$$dpm = \frac{cpm \times 100}{\% \eta}$$

3. Zur Berechnung der spezifischen Aktivität der einfließenden Glucose werden die ermittelten dpm (Absolutwerte) durch die Gesamtglucose dividiert.

4. Die Menge an pmol oxidierter Glucose bestimmt man durch Division der gemessenen Zerfälle (dpm) von $^{14}CO_2$ (äußeres Glas) durch den Wert der spezifischen Aktivität.

$$\text{pmol oxid. Glucose} = \frac{dpm\ ^{14}CO_2}{A}$$

A = spez.Aktivität = dpm/pmol

5. Die auf die gleiche Weise berechneten 'vorgetäuschten' pmol oxidierte Glucose für Proben ohne Inselmaterial (Backgrounds) werden nun von den Werten der übrigen Proben abgezogen.

pmol oxid. Glucose mit Inseln - pmol oxid. Glucose ohne Inseln = tatsächlich oxid. pmol Glucose

6. Berechnung des 'specific yield':

$$sy = \frac{\text{pmol oxidierte Glucose}}{\text{pmol utilisierte Glucose}}$$

7. Die jeweils ermittelten specific yields für 1-^{14}C-Glucose und 6-^{14}C-Glucose werden in die Formel

$$\frac{sy\ (C\text{-}1) - sy\ (C\text{-}6)}{1 - sy\ (C\text{-}6)} = \frac{3\ PPS}{1 + 2\ PPS}$$

eingesetzt und die Gleichung nach PPS aufgelöst. Um den Prozentsatz zu erhalten wird das Ergebnis mit 100 multipliziert. Die absolute Rate des PPS wird wie folgt berechnet:

$$PPS\ absolut = \frac{\text{pmol utilisierte Glucose} \times PPS\ \%}{100}$$

2.12 Versuchsablauf

2.12.1 Die THO-Bestimmung

Die THO-Bestimmung beruht auf der Methode von Ashcroft et al. (10). Die Hauptinkubationslösung wird aufgeteilt in drei Lösungen mit 5,5; 11,1 und 16,7 mM Glucose. Für jedes Hauptinkubationsgläschen (11 x 25mm) werden 0,5 ml benötigt. Aus der von Amersham gelieferten Originallösung an radioaktiv markierter Glucose wird eine wäßrige Verdünnung hergestellt, die 6 µCi/0,5 ml Aktivität enthält

(siehe Kapitel 2.10.4 Seite 34). Für jedes Gläschen werden 0,5 ml benötigt. Alle Lösungen sollten gekühlt werden, um die Vermehrung von Bakterien einzuschränken, da durch bakterielle Verstoffwechselung von Glucose während der Inkubation eine erhöhte CO_2-Produktion vorgetäuscht werden könnte. Sind diese Lösungen hergestellt, werden die Hauptinkubationsgefäße (= Stielgläschen) mit den Gummikappen versehen (siehe Abb.5) und in einem geeigneten Ständer auf Eis gesetzt. In jedes der Stielgläschen werden nun nacheinander je 5 Inseln, je 0,5 ml Hauptinkubationslösung mit entsprechender Glucosekonzentration und je 0,5 ml gereinigte und verdünnte, radioaktive 5-^{3}H-Glucose gegeben (6 μCi/0,5 ml). Zwei bis vier Gläschen je Ansatz enthalten keine Inseln, dafür aber eine entsprechende Menge Hanks' Lösung und werden ansonsten gleich behandelt. Sie dienen zur Bestimmung des Backgrounds. Wir erhalten auf diese Weise in den Gläschen 1ml einer

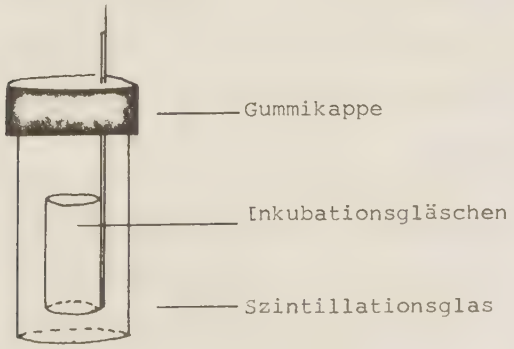


Abb. 5

physiologischkonzentrierten KRB-Albumin-Lösung, die 6 µCi/ml markierte Glucose und Glucosekonzentrationen von 5,6; 11,1 oder 16,7 mM enthält. Pro Gläschen werden jetzt noch 20 µl Insulinantiserum zugesetzt, die 1000 µE IRI binden können. Die Inkubationsgläschen werden aus dem Eisbad genommen, leicht geschüttelt um eine gleichmäßig konzentrierte Lösung zu erhalten und dann vorsichtig abgetrocknet. Die vor Versuchsbeginn auf die Stiele gezogenen Gummikappen werden weit hinuntergeschoben, mit Daumen und Zeigefinger umgebogen und über den Rand eines zweiten Gläschens (= Szintillationsglas, 27 x 60 mm) gestülpt. Das Stielgläschen hängt nun im Szintillationsglas, gehalten durch die Gummikappe. Durch sie werden zwei Kanülen gestochen, um die Inkubationslösung mit den Inseln 10 Minuten lang mit Carbogen zu begasen. Die Gläser werden dann (ohne Kanülen) zur Hauptinkubation 105 Minuten lang (15 Minuten Vorwärmzeit plus 90 Minuten Inkubationszeit) bei 37°C in ein thermostatiertes Wasserbad gestellt (Frequenz: 72 Schläge/Minute, Amplitude 12 mm). Damit 15 Minuten Vorwärmzeit auch sicher ausreichen, ist es notwendig die Stielgläschen möglichst tief ins Szintillationsglas einzuhängen.

Nach dieser Zeit werden die Gefäße aus dem Wasserbad herausgenommen und die Stielgläschen etwas hochgeschoben. In die äußeren Gläschen werden durch die Gummikappe hindurch 2 ml Wasser und sofort anschließend in die inneren Gläschen 0,1 ml N-HCl gespritzt und so die Reaktion im Stielglas

unterbrochen. Zur Gleichgewichtseinstellung beläßt man die Gefäße 24 Stunden lang bei Raumtemperatur im Schüttelbad (Frequenz: 72 Schläge/Minute, Amplitude 12 mm). Danach wird das Stielgläschen mit der Gummikappe vom Szintillationsglas getrennt. Aus dem Stielglas entnimmt man 0,1 ml Lösung (Absolutwert) und bringt sie in ein Plastik-Szintillationsgefäß ein. Es werden 10 ml Bray-Szintillationslösung zugesetzt und die Radioaktivität der Probe im LSC gezählt. In das dazugehörende äußere Glas werden ebenfalls 10 ml Bray-Lösung gegeben und die Probe dann 100 Minuten lang im LSC gemessen. Der Schreiber des Gerätes druckt die Ergebnisse in cpm aus und gibt jeweils die ESR für die Quenchkorrektur an.

2.12.2 Die $^{14}CO_2$-Bestimmung

Die $^{14}CO_2$-Bestimmung wird nach der Methode von Keen et al.(37) durchgeführt. Der Versuchsablauf entspricht weitgehend dem der THO-Bestimmung. Deshalb werden hier nur die Abweichungen besonders erwähnt.

1. Die radioaktiv markierte Glucose enthält entweder 1-^{14}C- oder 6-^{14}C-Glucose und die je Probe zugesetzte Radioaktivität beträgt 3 µCi/0,5 ml.
2. Nach der Hauptinkubation wird in das äußere Glas anstelle von Wasser 1 ml Hyaminhydroxid injiziert. Die Reaktion im inneren Gläschen wird durch Einspritzen von 0,1 ml

N-HCl unterbrochen und dadurch gleichzeitig noch in Lösung befindliches CO_2 übergetrieben.

3. Da Hyaminhydroxid als starke Base das gebildete CO_2 vollständig bindet, genügt es die Gläschen eine Stunde bei Raumtemperatur ruhig stehen zu lassen. Während dieser Zeit wird das gesamte CO_2 vom Hyaminhydroxid aufgenommen.
4. Zur Aufnahme von Hyaminhydroxid werden 10 ml Szintillationslösung auf Toluolbasis verwendet. Ansonsten verläuft die Messung der Radioaktivität genauso wie bei der THO-Bestimmung.
5. Vor der Zählung der radioaktiven Proben sollte man diese mindestens drei Stunden lang dunkel stellen, damit störende Fluoreszenserscheinungen abklingen können.

2.13 DNA-Bestimmung

Die DNA-Bestimmung beruht auf der spektrofluorimetrischen Methode von Kissane und Robins (38), die die Bildung eines fluoreszierenden Produkts aus 2-Desoxy-Aldosen mit 3,5-Diaminobenzoesäure in stark saurer Lösung benutzt. Die Methode ist von Beckmann (39) auf isolierte Langerhanssche Inseln übertragen worden und wird in leichter Abänderung (40) in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Es werden, wie in den entsprechenden Kapiteln (2.8.1 bis

2.8.3) angegeben, isolierte Langerhanssche Inseln aus fötalen, neugeborenen und erwachsenen Ratten gewonnen. Die frisch isolierten Inseln werden in eiskalter Hanks' Lösung, die 5,6 mM Glucose enthält, aufbewahrt und möglichst umgehend zu je fünf Stück in verschließbare Eppendorfgefäße überführt. Die Inseln müssen ohne jegliches exokrines Gewebe sorgfältig einpipettiert werden. Nach Absaugen der überstehenden Hanks' Lösung bis auf ca. 30 µl werden die Inseln unter dem Mikroskop nachgezählt, sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend gefriergetrocknet. Die Inseln werden dann bei -20°C im Tiefkühlfach aufbewahrt. Am Versuchstag werden die frisch aufgetauten DNA-Standards mit 30 µl Hanks' Lösung versetzt, um dieselben Verhältnisse wie in den Bestimmungsansätzen zu schaffen. Die Inseln in den Bestimmungsansätzen werden mit 30 µl Wasser versetzt; sie enthalten ja schon die Salze der Hanks' Lösung. Zu beiden Ansätzen werden nun je Probe 50 µl des Diaminobenzoesäure-Reagenz pipettiert, umgeschüttelt und die verschlossenen Reaktionsgefäße werden zur Umsetzung 40 Minuten lang bei 60°C im Wasserbad erhitzt.
Danach werden die Gefäße aus dem Wasserbad genommen und je Ansatz 500 µl kalte N-HCl zugegeben, umgeschüttelt und sofort die Fluoreszenz gemessen (Anregungswellenlänge 420 nm; Emissiom 500 nm).

2.14 Versuchsauswertung

Alle angegebenen Werte stellen Mittelwerte ± SEM dar, errechnet aus der in den Abbildungen und Tabellen angegebenen Anzahl (n) von Versuchen.
Für die Berechnung signifikanter Unterschiede wurde der t-Test nach Student verwendet, wobei ein t-Test für $p < 0{,}05$ als signifikant angesehen wurde.

3 VERSUCHSERGEBNISSE

Alle Versuchsergebnisse sind auf jeweils fünf Inseln bezogen, entsprechend der Anzahl Inseln je Inkubationsglas. Alle Proben enthalten 20 µl Insulinantiserum um 1000 µE IRI zu binden, damit freigesetztes Insulin nicht durch einen Feedback-Mechanismus seine eigene Sekretion und damit die Aktivität des PPS hemmen kann (25). Eine Betrachtung der Resultate in Abhängigkeit von der Größe, dem Gewicht oder dem DNA-Gehalt der Inseln erfolgt an späterer Stelle.

3.1 Glucoseutilisation

Die Versuchsergebnisse der Glucoseutilisation sind in der Abbildung Nr. 6 und in den Tabellen Nr. 1, 2, 3 wiedergegeben.

Die Messung der Glucoseutilisation ergibt bei Müttern eine Erhöhung an utilisierter Glucose, wenn die Glucosekonzentration im Medium von 5,6 auf 11,1 und 16,7 mM Glucose gesteigert wird, jedoch sind die Meßwerte untereinander nicht signifikant verschieden. So beträgt die Bildung von THO aus 5-^{3}H-Glucose bei 5,6 mM 219, bei 11,1 mM 353 und bei 16,7 mM Glucose 321 pmol/90 min/5 Inseln utilisierte Glucose.

Ein ganz ähnliches Bild ergibt sich bei Neugeborenen und Föten. Auch bei Ihnen liegt eine Steigerung der Utilisation in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration vor und auch hier sind die Meßwerte nicht signifikant voneinander verschieden. Die Utilisationswerte liegen in der gleichen Größenordnung wie die der Mütter. Auch der Vergleich der Meßwerte von Müttern, Neugeborenen und Föten, bei einer bestimmten Glucosekonzentration, läßt keine signifikanten Unterschiede erkennen. Föten, Neugeborene und Mütter utilisieren bei gegebener Glucosekonzentration gleichviel pmol/90 min/5 Inseln Glucose.

Wenn auch die Steigerung der Glucoseutilisation statistisch nicht zu sichern ist, kann man doch annehmen, daß es sich

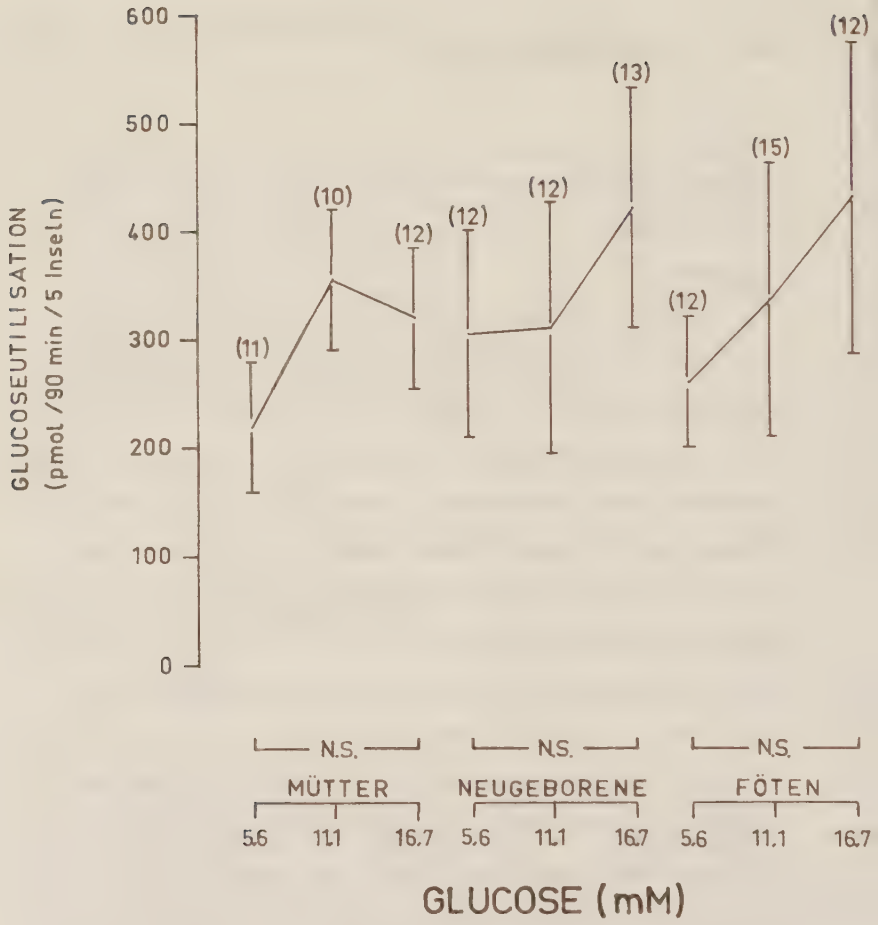


Abb.6:
Einfluß der Glucosekonzentration auf die Bildung von THO aus 5-^{3}H-Glucose in isolierten Langerhansschen Inseln der fötalen, neugeborenen und trächtigen Ratte bei Inkubation von 5 Inseln in 1 ml, während 90 Minuten in Gegenwart von 5,6; 11,1 und 16,7 mM Glucose und von Insulinantiserum, um 1000 μE IRI zu binden.
Mittelwerte $\pm$ SEM; Anzahl der Versuche in Klammern

um eine echte Zunahme handelt. Es sind in erster Linie methodische Gründe, die zu den relativ großen Streuungen führen. So stehen nur sehr geringe Mengen an Inselgewebe zur Verfügung und das Inselgewicht kann nicht im Einzelfall bestimmt werden.

3.2. Glucoseoxidation

Die Versuchsergebnisse sind in den Abbildungen Nr.7, 8, 9 und in den Tabellen Nr. 1, 2, 3 aufgeführt.
Die Messung der 1-^{14}C-Glucoseoxidation zeigt bei Müttern und Neugeborenen einen Anstieg der Oxidation in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration. So steigt die 1-^{14}C-Oxidation bei Müttern signifikant von 20 auf 62 und 85 pmol/90 min/5 Inseln oxidierte Glucose, entsprechend Glucosekonzentrationen von 5,6; 11,1 und 16,7 mM Glucose im Inkubationsmedium. Bei Neugeborenen erhöht sich die 1-^{14}C-Glucoseoxidation unter denselben Bedingungen von 29 auf 43 und 88 pmol/90 min/5 Inseln oxidierte Glucose ebenfalls signifikant und die Umsätze erreichen dieselbe Größenordnung. Bei Müttern wird in Gegenwart von 16,7 mM Glucose viermal, bei Neugeborenen dreimal soviel 1-^{14}C-Glucose zu CO_2 verstoffwechselt wie bei 5,6 mM Glucose im Medium. Bei entsprechender Glucosekonzentration sind die 1-^{14}C-Glucoseoxidationswerte von Müttern und Neugeborenen nicht

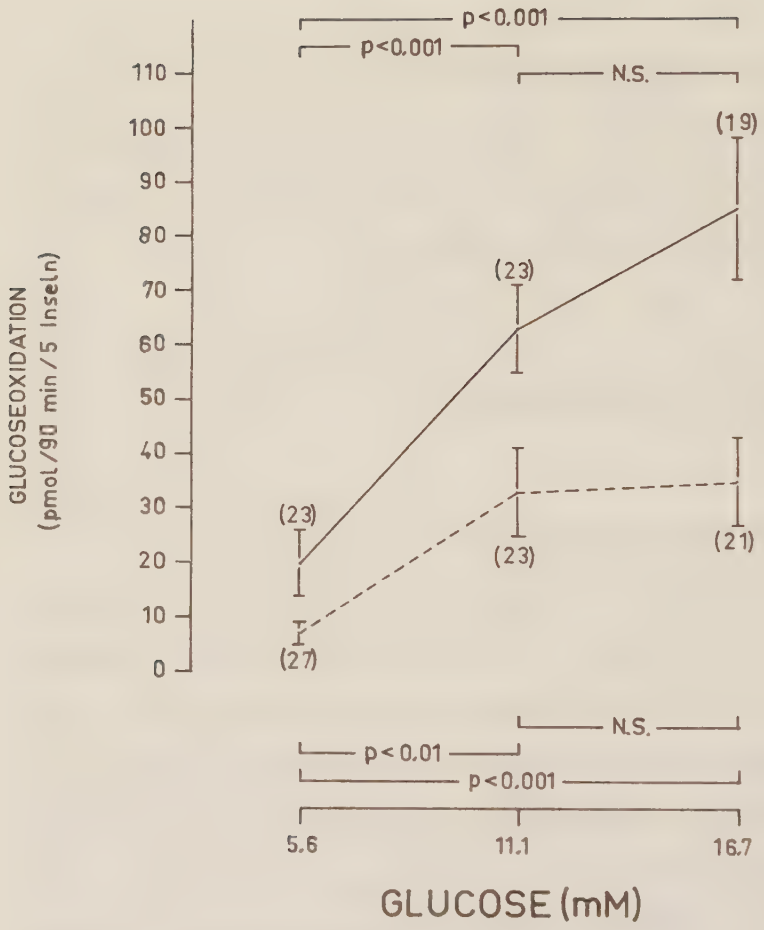


Abb.7:
Einfluß der Glucosekonzentration auf die Bildung von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Glucose und 6-^{14}C-Glucose in isolierten Langerhansschen Inseln der trächtigen Ratte (21.Tag p.c.) bei Inkubation von 5 Inseln in 1 ml während 90 Minuten in Gegenwart von 5,6; 11,1 und 16,7 mM Glucose und von Insulinantiserum, um 1000 µE IRI zu binden.
Mittelwerte ± SEM; Anzahl der Versuche in Klammern
——— 1-^{14}C-Glucoseoxidation
- - - 6-^{14}C-Glucoseoxidation

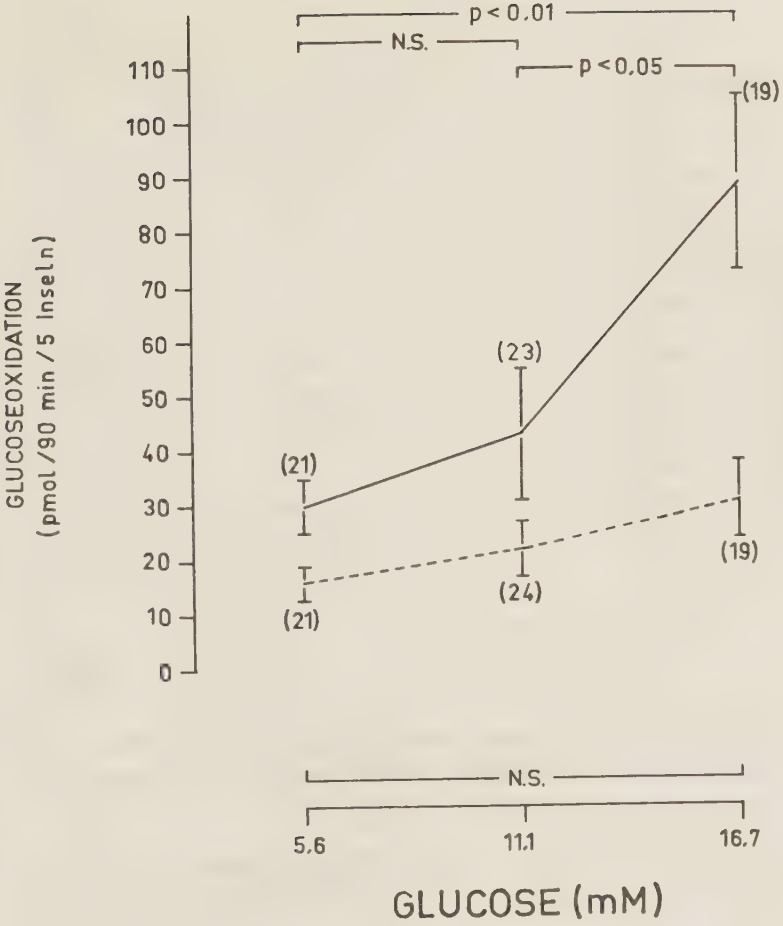


Abb.8:
Einfluß der Glucosekonzentration auf die Bildung von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Glucose und 6-^{14}C-Glucose in isolierten Langerhansschen Inseln der neugeborenen Ratte (5.Tag p.p.) bei Inkubation von 5 Inseln in 1 ml, während 90 Minuten in Gegenwart von 5,6; 11,1 und 16,7 mM Glucose und von Insulinantiserum, um 1000 μE IRI zu binden.
Mittelwerte $\pm$ SEM; Anzahl der Versuche in Klammern
——— 1-^{14}C-Glucoseoxidation
- - - 6-^{14}C-Glucoseoxidation

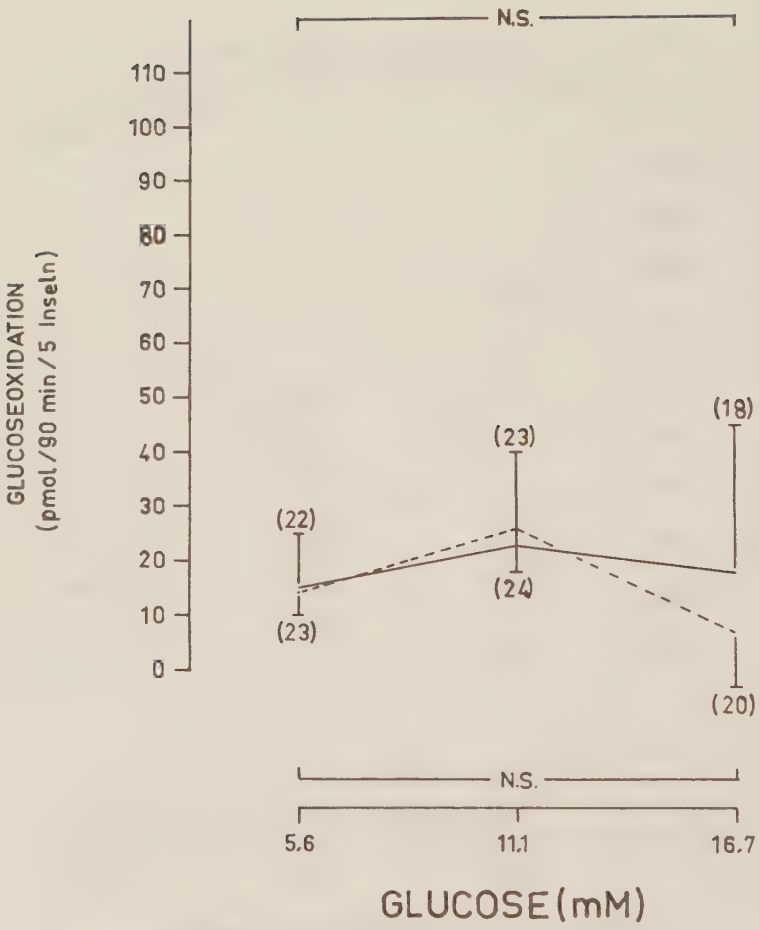


Abb.9:
Einfluß der Glucosekonzentration auf die Bildung von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Glucose und 6-^{14}C-Glucose in isolierten Langerhansschen Inseln der fötalen Ratte (21.Tag p.c.) bei Inkubation von 5 Inseln in 1 ml während 90 Minuten in Gegenwart von 5,6; 11,1 und 16,6 mM Glucose und von Insulinantiserum, um 1000 µE IRI zu binden.
Mittelwerte $\pm$ SEM; Anzahl der Versuche in Klammern
——— 1-^{14}C-Glucoseoxidation
- - - 6-^{14}C-Glucoseoxidation

signifikant verschieden.

Die 6-^{14}C-Glucoseoxidationswerte der Mütter steigen mit Erhöhung der Glucosekonzentration von 5,6 auf 11,1 und 16,7 mM Glucose signifikant von 7 auf 33 und 35 pmol/ 90 min/5 Inseln oxidierte Glucose an. Dies ist eine Steigerung um das fünffache des Ausgangswertes. Bei Neugeborenen ist zwar eine Erhöhung der 6-^{14}C-Glucoseoxidation um das zweifache zu beobachten, jedoch ist sie nicht signifikant. Die Werte betragen mit steigender Glucosekonzentration 15; 22 und 30 pmol/90 min/5 Inseln oxidierte Glucose. Die Meßwerte der Neugeborenen sind nicht signifikant verschieden von denen der Mütter.

Vergleicht man die 1-^{14}C-Glucoseoxidationswerte der Mütter mit ihren entsprechenden 6-^{14}C-Glucoseoxidationswerten, so ist bei jeder Glucosekonzentration der 6-^{14}C-Wert signifikant niedriger als der dazugehörige 1-^{14}C-Wert. Auch bei Neugeborenen sind die 6-^{14}C-Glucoseoxidationswerte deutlich niedriger, als die entsprechenden 1-^{14}C-Glucoseoxidationswerte, jedoch sind nur bei 16,7 mM Glucose die Werte signifikant voneinander verschieden.

Ein völlig anderes Bild zeigen die Meßwerte der fötalen Inseln. Die 1-^{14}C-Glucoseoxidation erhöht sich nicht signifikant von nur 15 auf 23 bzw. 18 pmol/90 min/5 Inseln oxidierte Glucose, bei Steigerung der Glucosekonzentration von 5,6 auf 11,1 und 16,7 mM Glucose. Diese Werte liegen signifikant niedriger als die 1-^{14}C-Glucoseoxidationswerte der Mutter bei vergleichbarer Stimulation mit 11,1 und

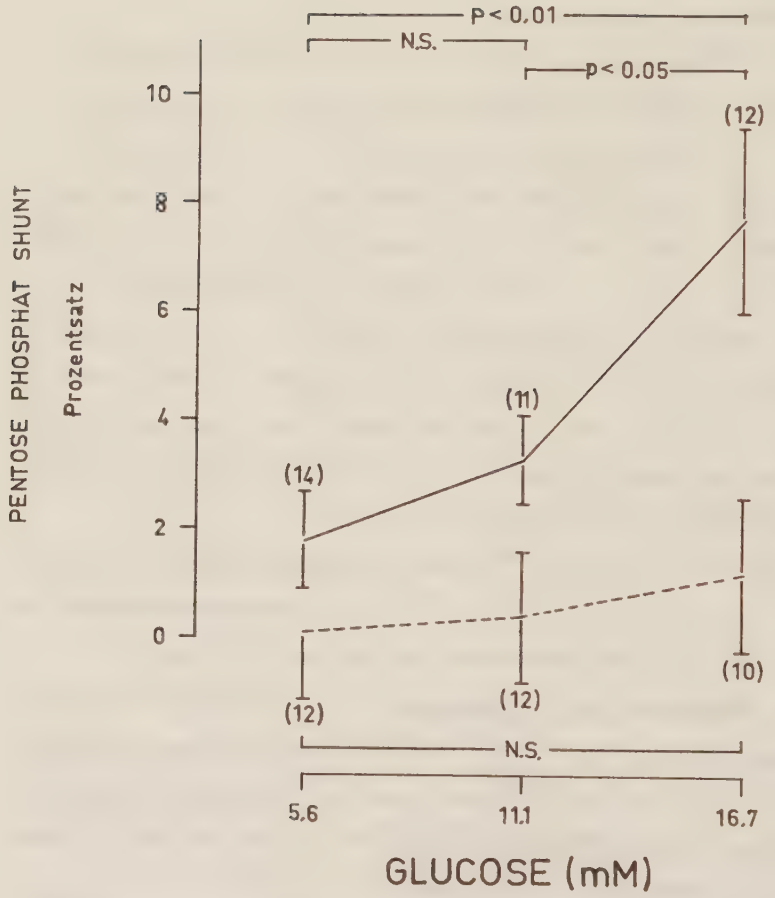


Abb.10:
Einfluß der Glucosekonzentration auf den PPS in isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte bei Inkubation von 5 Inseln in 1 ml während 90 Minuten in Gegenwart von 5,6; 11,1 und 16,7 mM Glucose und von Insulinantikörper, um 1000 μE IRI zu binden.
Mittelwerte $\pm$ SEM; Anzahl der Versuche in Klammern
——— Mütter
- - - Föten

16,7 mM Glucose im Medium. Die 1-^{14}C-Glucoseoxidation bei Föten ist im überprüften Bereich von 5,6 bis 16,7 mM Glucose also nicht glucoseabhängig und liegt ungefähr auf dem Niveau der 1-^{14}C-Glucoseoxidation der Mütter bei 5,6 mM Glucose. Auch die 6-^{14}C-Glucoseoxidation der Föten ist durch steigende Glucosekonzentration im Bereich von 5,6 bis 16,7 mM Glucose nicht stimulierbar und ist im Gegensatz zu Müttern und Neugeborenen auch bei 16,7 mM Glucose im Medium nicht verschieden von der dazugehörigen 1-^{14}C-Glucoseoxidationsrate. Die 6-^{14}C-Glucoseoxidation kann sogar höher liegen als die entsprechende 1-^{14}C-Oxidation, eine Beobachtung, die bei Müttern und Neugeborenen nicht gemacht werden kann.

3.3 Prozentualer Anteil des Pentosephosphatshunts

Der aus den Versuchsergebnissen der Glucoseutilisation und der Glucoseoxidation errechnete prozentuale Anteil des PPS an der Glucoseoxidation, ist in den Abbildungen Nr. 10 und 11 und in den Tabellen Nr. 1, 2, 3 wiedergegeben. Der prozentuale Anteil des PPS bei der Mutter steigt signifikant an, wenn die Glucosekonzentration von 1,8 auf 3,3 auf 7,7 Prozent erhöht wird. Das bedeutet eine Steigerung um das vierfache.

Bei Neugeborenen nimmt der prozentuale Anteil des PPS um

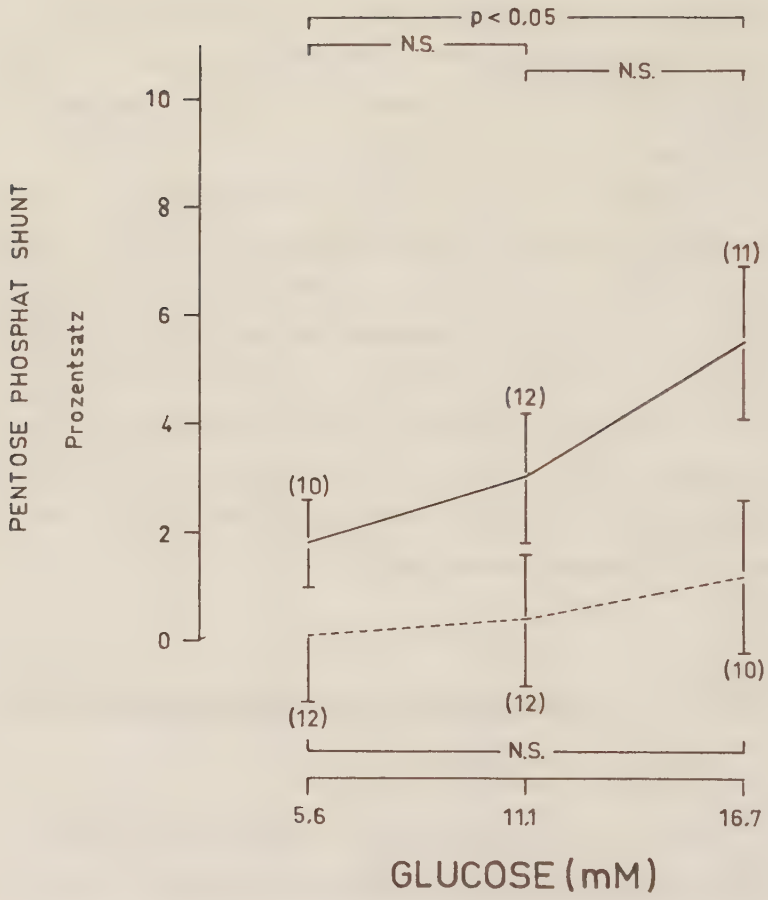


Abb.11:
Einfluß der Glucosekonzentration auf den PPS in isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte bei Inkubation von 5 Inseln in 1 ml während 90 Minuten in Gegenwart von 5,6; 11,1 und 16,7 mM Glucose und von Insulinantikörper, um 1000 µE IRI zu binden.
Mittelwerte ± SEM ; Anzahl der Versuche in Klammern
——— Neugeborene
- - - Föten

das dreifache zu, nämlich von 1,8 auf 2,9 auf 5,5 Prozent. Die Steigerung ist signifikant und die Werte sind ähnlich denen der Erwachsenen. Auch sind sie bei vergleichbarer Glucosekonzentration nicht signifikant von den Erwachsenen unterschieden.
Der Prozentsatz des PPS liegt bei Inseln von Föten deutlich niedriger und erreicht auch bei Stimulierung mit 16,7 mM Glucose nicht annähernd den Wert, den die Mutter nach Stimulation mit lediglich 5,6 mM Glucose aufweist. Es ist zwar auf Grund der Zahlenwerte zwischen 5,6 und 16,7 mM Glucose im Medium eine Erhöhung des prozentualen Anteils des PPS festzustellen, jedoch ist diese, bedingt durch die außergewöhnlich große Standardabweichung bei allen fötalen Messungen, unbedeutend. Es liegt also im Gegensatz zu Müttern und Neugeborenen keine glucoseabhängige Steigerung des prozentualen Anteils des PPS vor.

3.4 Absolute Rate des Pentosephosphatshunts

Die aus den Versuchsergebnissen der Glucoseutilisation und des prozentualen PPS-Anteils berechnete absolute Rate des PPS ist in den Abbildungen Nr. 12 und 13 und in den Tabellen Nr. 1, 2, 3 aufgeführt.
Für die Langerhansschen Inseln von Müttern ergibt die Berechnung der absoluten PPS-Rate eine deutlich signi-

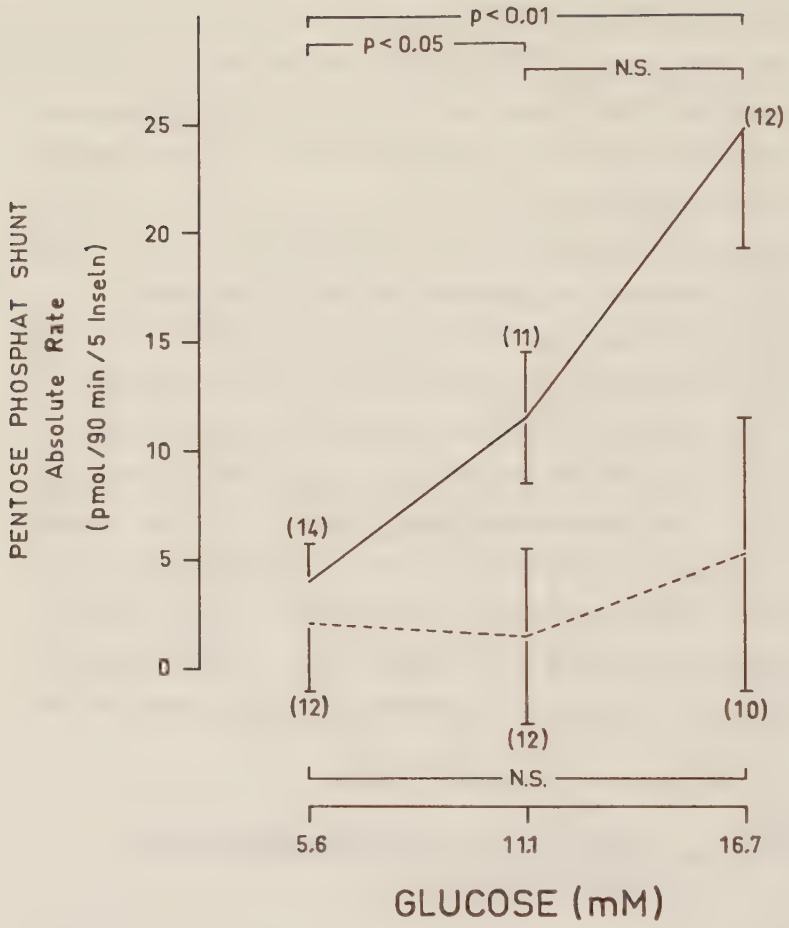


Abb.12:
Einfluß der Glucosekonzentration auf den PPS in isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte bei Inkubation von 5 Inseln in 1 ml während 90 Minuten in Gegenwart von 5,6; 11,1 und 16,7 mM Glucose und von Insulinantiserum, um 1000 µE IRI zu binden.
Mittelwerte ± SEM; Anzahl der Versuche in Klammern
——— Mütter
- - - Föten

fikante Erhöhung des PPS in Abhängigkeit steigender Glucosekonzentrationen. Bei Erhöhung der Glucosekonzentration von 5,5 auf 16,7 mM Glucose steigt der absolute Wert des PPS um das sechsfache von 3,9 auf 24,7 pmol/90 min/ 5 Inseln Glucose an. Auch der Anstieg der Glucosekonzentration von 5,5 mM auf 11,1 mM Glucose führt bereits zu einer signifikanten Erhöhung der absoluten PPS-Rate.

Bei Inseln von Neugeborenen läßt sich ebenso eine Abhängigkeit des absoluten Wertes des PPS von der Glucosekonzentration im Medium feststellen. Der PPS erhöht sich signifikant von 5,5 pmol/90 min/5 Inseln bei einer Glucosekonzentration von 5,6 mM Glucose auf 23,4 pmol/90 min/ 5 Inseln in Gegenwart von 16,7 mM Glucose. Dies entspricht einer Steigerung um das vierfache.
Auch hier zeigen die fötalen Inseln ein abweichendes Verhalten. Zwar ist noch eine geringe Erhöhung des PPS um das zweifache bei der Steigerung der Glucosekonzentration von 5,6 auf 16,7 mM Glucose festzustellen, jedoch ist dieser Anstieg von 1,9 auf 5,2 pmol/90 min/ 5 Inseln Glucose nicht signifikant. Es liegt also auch bei der Berechnung der absoluten PPS-Rate keine glucoseabhängige Steigerung des Pentosephosphatshunts vor. Dies steht im deutlichen Gegensatz zu den Ergebnissen bei Müttern und Neugeborenen.

Wenn auch bei vergleichbarer Glucosekonzentration die geringere absolute PPS-Rate der Föten offensichtlich ist, so

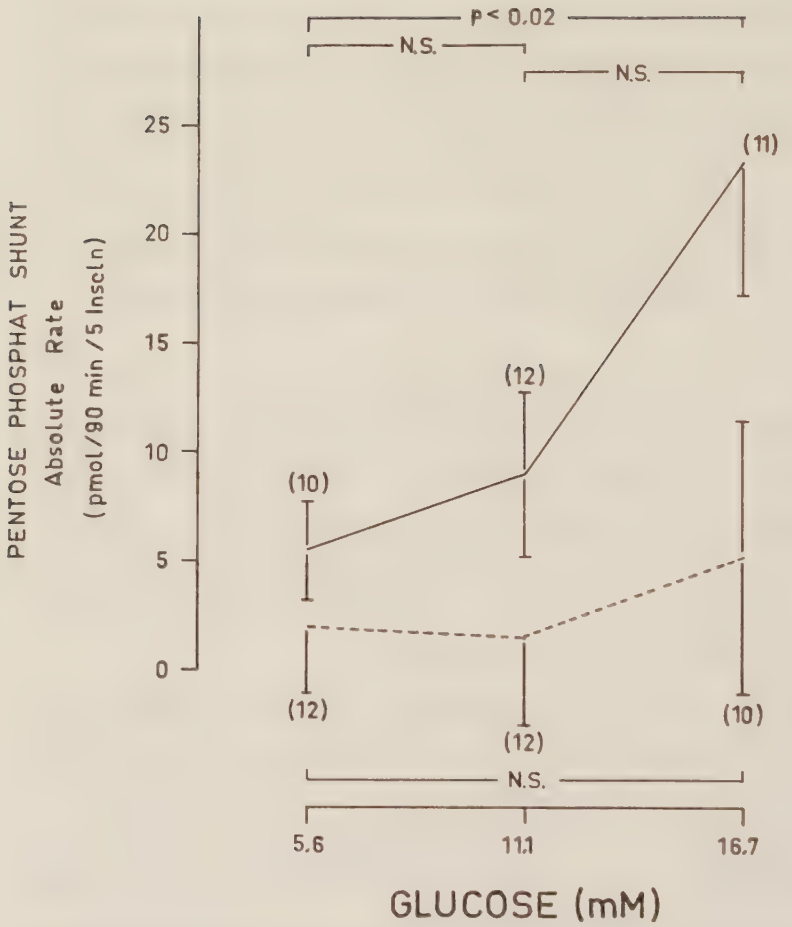


Abb.13:
Einfluß der Glucosekonzentration auf den PPS in isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte bei Inkubation von 5 Inseln in 1 ml während 90 Minuten in Gegenwart von 5,6; 11,1 und 16,7 mM Glucose und von Insulinantiserum, um 1000 μE IRI zu binden.
Mittelwerte $\pm$ SEM; Anzahl der Versuche in Klammern
——— Neugeborene
- - - Föten

ist doch auf Grund der großen Standardabweichung der fötalen Werte nur der bei 16,7 mM Glucose gemessene Wert des fötalen PPS signifikant niedriger, als der entsprechende Wert der Mutter. Fötale Inseln erreichen bei Stimulierung mit 16,7 mM Glucose nur eine absolute PPS-Rate, die der der Mütter bei 5,6 mM Glucose entspricht.

3.5 Ergebnisse der DNA-Bestimmung

Die Ergebnisse der DNA-Bestimmung sind in der Abb.Nr. 14 wiedergegeben.
Für erwachsene Tiere im Alter von drei Monaten ergibt die Bestimmung einen Gehalt von 38,1 $\pm$ 2,2 ng DNA/Insel. Dieses Resultat stimmt überein mit Befunden von Kallenberger (35,6 $\pm$ 1,9 ng DNA/Insel (40)) und Agren et al. (43,6 $\pm$ 3,2 ng DNA/Insel (41)) und Schauder et al. (40,8 $\pm$ 1,0 ng DNA/Insel (42)). Inseln trächtiger Ratten weisen am 21.Tag p.c. einen höheren DNA-Gehalt auf als nicht trächtige Ratten. Es werden 48,0 $\pm$ 2,6 ng DNA/Insel gefunden. Dieser Wert ist signifikant verschieden (p 0,02) von dem der erwachsenen Tiere. Dies stimmt auch weitgehend mit den Angaben in der Literatur überein (43).

Fötale Inseln haben einen geringen DNA-Gehalt von nur

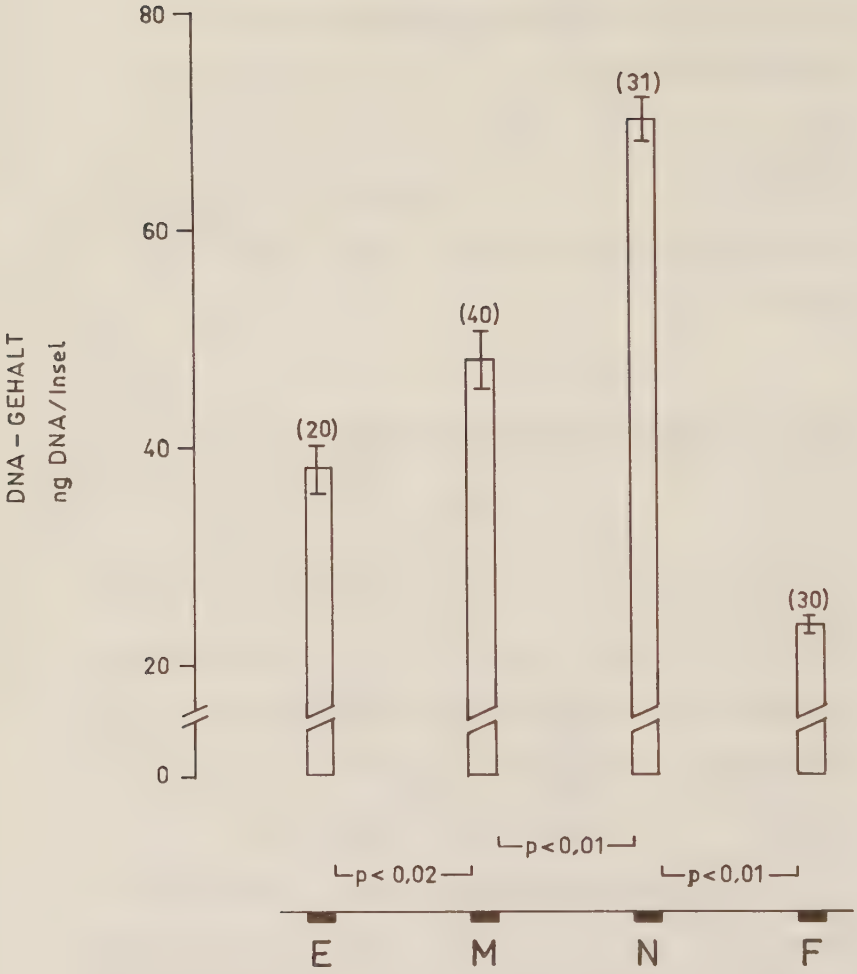


Abb.14:
DNA-Gehalt in Langerhansschen Inseln der erwachsenen (E), der trächtigen (M), der neugeborenen (N) am 5. Tag p.p. und der fötalen Ratte (F) am 21.Tag p.c..
Mittelwerte $\pm$ SEM; Anzahl der Versuche in Klammern

23,5 ± 1,5 ng DNA/Insel. Dieses Ergebnis überrascht nicht, da fötale Inseln wesentlich kleiner sind als die von Erwachsenen und ein konstantes Verhältnis zwischen DNA-Gehalt, Inseltrockengewicht und Inselgröße (cross-sectional area) besteht (44, 45). Fötale Inseln besitzen deshalb weniger Zellen pro Insel. In der Literatur finden sich keine Angaben über den DNA-Gehalt von fötalen Inseln, jedoch liegen von Agren et al. (41) Untersuchungen an neugeborenen Ratten vor, deren Inseln 6 bis 16 Stunden nach der Geburt isoliert wurden. Sie finden einen DNA-Gehalt von 22,9 ng DNA/Insel, ein Ergebnis, welches recht gut mit den hier gefundenen Werten übereinstimmt. Der fötale DNA-Gehalt ist signifikant verschieden, von dem der Erwachsenen (3 Monate alt), Müttern (21.Tag p.c.) und Neugeborenen (5.Tag p.p.).

Überraschend ist dagegen die Feststellung, daß neugeborene Ratten einen wesentlich höheren DNA-Gehalt je Insel als Erwachsene oder sogar Mütter aufweisen. Der DNA-Gehalt beträgt 69,9 ± 2,0 ng DNA/Insel, obwohl die Neugeborenen am 5.Tag p.p. kleinere Inseln besitzen, als erwachsene Ratten. Der Wert ist signifikant ($p < 0,001$) verschieden von dem der trächtigen, der drei Monate alten und der fötalen Ratten. Um Fehlerquellen auszuschließen, die z.B. durch eine subjektive Auswahl von Inseln durch eine Person verursacht werden könnten, ist in vergleichenden Untersuchungen in unserem Arbeitskreis dieser hohe DNA-Gehalt bei Neugebore-

nen (5.Tag p.p.) mehrmals bestätigt worden. Eine Erklärung für diese drastische Veränderung des DNA-Gehaltes innerhalb weniger Tage könnte sein, daß gerade in diesem Stadium eine erhöhte Teilungsaktivität vorliegt. Man kann aber zu diesem Zeitpunkt noch keine wesentliche Volumenvergrößerung der Inseln feststellen.

4 DISKUSSION

4.1 Biosynthese und Sekretion von Insulin in der Fötal- und Perinatalzeit

4.1.1 Biosynthese

Die physiologische Bedeutung des Insulins während der Fötalzeit ist noch weitgehend ungeklärt. Bei Säugern wird in der B-Zelle der Langerhansschen Insel bereits während der frühen intrauterinen Entwicklung Insulin synthetisiert (46) und bereits vor der Geburt sezerniert (3, 47, 48, 49). Im Pankreas von Rattenföten kann am 11,5. Tag p.c. die Synthese von Proinsulin nachgewiesen werden (50, 51). Ab dem 14. Tag der Tragzeit findet eine Umwandlung von Proinsulin in Insulin statt, welches in der B-Zelle gespeichert wird. Insulin und Glucagon sind im fötalen Pankreas bereits zu einer Zeit vorhanden, zu der die entsprechenden hormonproduzierenden A_1-, A_2- und B-Zellen noch nicht histologisch nachweisbar sind. Glucagon liegt während der frühen Entwicklungsphase (ca. 11. Tag p.c.) in größerer Menge vor als das Insulin, während am Ende der Tragzeit das Insulin überwiegt (52). Im Blut des Föten sind Insulin und Glucagon dagegen erst vom 17. Tag p.c. an nachgewiesen worden. A_2-Zellen

werden nach dem 11. Tag p.c., A_1-Zellen erst nach dem 14.Tag p.c. und die B-Zellen nach dem 16. Tag p.c. gefunden (53). Orci et al.(54) beobachteten, daß A-Zellen im fötalen Rattenpankreas am 18.Tag der Tragzeit nachweisbar sind und daß zu dieser Zeit jedoch der Anteil der B-Zellen deutlich überwiegt. Auch aus älteren Untersuchungen von Hard 1944 (55), Nerenberg 1954 (56) und Angerwall, Hellerström und Hellman 1962 (57) geht hervor, daß in Inseln von Föten das Verhältnis von A zu B-Zellen während der letzten Tage der Tragzeit zugunsten der B-Zellen verschoben ist. Diese zelluläre Zusammensetzung ändert sich in der Insel auch während der ersten Lebenstage kaum (58, 59).

Während es scheint, daß die B-Zelle schon im frühen fötalen Leben die Fähigkeit entwickelt hat, Proinsulin zu bilden und in Insulin umzuwandeln, ist der Mechanismus, der diesen Stoffwechsel vor der Geburt stimuliert, ungeklärt (8). Asplund vermutet zwei getrennte Wege über die Glucose auf die B-Zelle einwirken kann. Der eine Weg führt zu einer stimulierenden Wirkung der Glucose auf die Insulinbiosynthese (60,61) und nur dieser wird von der fötalen B-Zelle wahrgenommen. Der zweite Weg führt zu einem Signal für die Insulinsekretion, auf welches die B-Zelle, wie später noch zu diskutieren ist, jedoch nicht reagiert. Diese Sicht der Dinge steht in Einklang mit Beobachtungen (62, 63), die zeigen, daß die Stimulierung der Insulinbiosynthese durch Glucose mit einem Anstieg der RNA in der Pankreasinsel einhergeht, daß aber durch diese Erhöhung des RNA-Gehaltes der Sekretions-

mechanismus der B-Zelle nicht beeinflußt wird. Aus den bisher besprochenen Befunden ergibt sich weiter, daß die nicht vorhandene oder nur geringe Insulinantwort auf Glucose in den B-Zellen von Föten und Neugeborenen nicht auf einem Mangel an neusynthetisiertem Hormon beruhen kann. Ganz im Gegenteil ist sogar mit einer überschießenden Insulinbiosynthese zu rechnen, wenn die fötale 'unreife' B-Zelle erhöhten Glucosekonzentrationen ausgesetzt wird. Diese Vermutung bestätigte Lambert (64) an Inseln von 18 Tage alten Rattenföten.
Duran et al. (65) fanden in ihren Untersuchungen, daß der stimulierende Einfluß des Cyclo-AMP-Phosphodiesterase-Systems auf die Insulinbiosynthese bei Inseln von Neugeborenen (3.Tag p.p.) größer ist als bei Inseln von Erwachsenen. Auch bei diesen Untersuchungen zeigt sich, daß die Wirkung einer Aktivierung des Cyclo-AMP-Systems bei Inseln größer ist, als die auf die Sekretion von Insulin.

4.1.2 Sekretion

4.1.2.1 Einfluß von Glucose

Trotz der als erwiesen anzusehenden Tatsache, daß die Insulinbiosynthese im Föten funktioniert und Insulin in der B-Zelle vorhanden ist, können viele Autoren während der perinatalen Phase (19.Tag p.c. bis 2.Tag p.p.) weder in vivo noch in vitro eine durch Glucose stimulierbare Insulinfreisetzung beobachten (4, 8, 9, 66).

Von Asplund wurde die Dynamik der Insulinsekretion mit Hilfe von Perifusionsversuchen (in vitro) an Stücken von fötalem und neonatalem Pankreasgewebe der Ratte untersucht (67). Danach zeigten Föten am 21,5.Tag p.c. nach Stimulierung mit 16,7 mM Glucose nur einen kleinen ersten Peak, jedoch keinen zweiten Peak der Insulinsekretion. Am 1.Tag p.p. erfolgt zusätzlich eine schwach ausgeprägte zweite Sekretionsphase. Am 6. Tag p.p. ist dann ein gut ausgebildeter erster Peak und eine deutliche zweite Phase der Insulinsekretion zu erkennen, ähnlich wie bei erwachsenen Ratten. Asplund folgert daraus, daß der Antwortmechanismus im Föten, was den ersten Peak anbetrifft, zwar schon vorhanden, daß dieser aber noch nicht voll ausgereift ist und die zweite Phase der Sekretion postnatal erst entwickelt werden muß.

Agren, Andersson und Hellerström (41) fanden, daß eine Insulinsekretion in der neugeborenen Ratte (bis 16 Std.p.p.) doch stattfindet. Allerdings bestehen erhebliche quantitative Unterschiede in der stimulierenden Wirkung der Glucose im Vergleich zu Inseln erwachsener Ratten. Während von Agren et al. (41) bei Erhöhung der Glucosekonzentration von 0 auf 1,4 mM (!) eine Freisetzung von Insulin von umgerechnet 148 µE IRI auf 247 µE IRI/5 Inseln/90 min erfolgt, findet man bei Inseln erwachsener Ratten im allgemeinen bei 16,7 mM Glucose Insulinmengen von ca. 600-1000 µE/5 Inseln/90 min je ml Inkubationsmedium, bei Agren et al. werden jedoch sogar bei weiterer Erhöhung der Glucosekonzentration

auf 27,8 mM nur 214 µE IRI/5Inseln/90 min sezerniert. (Inkubationsbedingungen: 10 Inseln/250 µl/1 Std.)

Also kann man davon ausgehen, daß auch bei den Untersuchungen von Agren et al. die Inseln neugeborener Ratten auf einen hohen Glucosereiz nur geringfügig ansprechen und die Autoren sprechen daher auch eher von einer Linksverschiebung der effektiven Glucosekonzentration beim Pankreas des Neugeborenen.
Auch Sodoyez-Goffaux et al. (68, 69) finden an isolierten Langerhansschen Inseln der fötalen Ratte ab dem 19.Tag p.c. und Neugeborenen bis zum 2.Tag p.p. eine glucoseinduzierte Insulinsekretion. Bei diesen Autoren ist jedoch die durch Glucose induzierbare Sekretion von Insulin (etwa Faktor 2 gegenüber Kontrollen) wesentlich geringer als bei Inseln von erwachsenen Ratten, bei denen bei einer vergleichbaren Glucosekonzentration ein Faktor von 5 bis 10 anzusetzen ist.

4.1.2.2 Primingeffekt

Von Grill et al. und Grodsky et al. (70, 71) wurde gezeigt, daß das isolierte Rattenpankreas nach einer Vorperfusion mit einem Glucose enthaltenden Medium wesentlich mehr Insulin auf einen erneuten Glucosereiz ausschüttet als wenn eine Vorperfusion mit Glucose nicht stattgefunden hat. Die Autoren schließen daraus, daß durch dieses Priming mit Glucose offenbar Mechanismen der Sekretion in Gang kommen,

die die Stimulierung der Sekretion von Insulin durch Glucose erleichtern.

Auch Asplund K. (72) kommt in seinen Untersuchungen nach einer Art Priming, das allerdings vom Autor nicht als solches angesprochen wird, zu dem Ergebnis, daß Föten durchaus auf Glucosereiz mit einer Insulinsekretion reagieren können. Der Autor findet, daß die Reifung der B-Zelle vor der Geburt durch eine nur geringe und kurzzeitige Erhöhung des Blutglucosespiegels bei der Mutter entscheidend beeinflußt wird. Inseln von Föten glucoseinfundierter Mütter zeigen am 21.Tag p.c. bei Stimulation mit 16,7 mM Glucose in vitro eine signifikant erhöhte Insulinfreisetzung um das zweifache des Kontrollwertes. Asplund schließt aus seinen Ergebnissen, daß die fötale B-Zelle über einen glucoseabhängigen Glucorezeptor verfügen müsse, der an der Regulation der Insulinfreisetzung beteiligt ist. Angeregt wurden diese Untersuchungen durch Beobachtungen am Menschen: Neugeborene von diabetischen Müttern weisen direkt nach der Geburt eine Inselhyperplasie (73), einen erhöhten Insulinspiegel im Blut (74, 75) und eine erhöhte Empfindlichkeit der B-Zelle gegenüber Glucose auf, wenn man sie mit Neugeborenen nicht diabetischer Mütter vergleicht (74, 76, 77). Aus den Befunden von Asplund könnte man den Schluß ziehen, daß in einer normalen Fötalzeit der Mechanismus der glucoseinduzierten Insulinsekretion nicht voll ausgebildet ist, daß er sich jedoch durch eine längerdauernde Hyperglykämie der Mutter, sei sie durch einen Diabetes oder eine entsprechende Glucoseinfusion bedingt, in

Gang setzen läßt. Es bleibt hier freilich offen, ob durch eine solche Hyperglykämie auch der Glucoseabbau über die Glykolyse und den PPS wie später noch diskutiert wird stimuliert werden kann.

4.1.2.3 Einfluß von D-Glycerinaldehyd

Die Sekretion von Insulin wird bei Inseln erwachsener Ratten durch D-Glycerinaldehyd stimuliert (41, 78). Folgt man den vergleichenden Untersuchungen von Agren et al. (41), so zeigt sich, daß vom quantitativen Aspekt her gesehen, die Inseln von Neugeborenen(1.Tag p.p.) auf D-Glycerinaldehyd etwa gleich viel Insulin sezernieren, wie die Inseln von erwachsenen Ratten. Offensichtlich besteht, was den Mechanismus der Sekretion beim D-Glycerinaldehyd angeht, kein Unterschied zwischen den Inseln von neugeborenen und erwachsenen Ratten (auf DNA-Basis). Unter der Voraussetzung, daß D-Glycerinaldehyd nach seiner Aufnahme in die B-Zelle phosphoryliert wird und dann als solches bzw. als weiterer Metabolit des glykolytischen Kohlenhydratabbaus den Sekretionsmechanismus stimuliert, liegen die Änderungen, die die Wandlung von der 'unreifen' zur 'erwachsenen' Insulinantwort bedingen, vor dem Triosephosphat-Schritt in der Glykolyse. D-Glycerinaldehyd erscheint in der Glykolyse am Triosephosphat-Schritt und stimuliert deshalb die Insulinsekretion unabhängig von der Glucosephosphorylierung in der B-Zelle. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Befunden, nach denen in der B-Zelle von Neu-

geborenen starke Veränderungen in der Fähigkeit zur Glucosephosphorylierung erfolgen (78) und sie könnten darauf hinweisen, daß das Enzymsystem der Glucosephosphorylierung für die Regulation (10, 79) der Insulinfreisetzung von Bedeutung ist. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, daß sich der Effekt des D-Glycerinaldehyds auf die Insulinsekretion bei erwachsenen Mäusen durch Mannoheptulose, einer Verbindung von der man weiß, daß sie die Glucosephosphorylierung in der B-Zelle verhindert, nicht hemmen läßt, daß Mannoheptulose andererseits aber die durch Glucose induzierbare Insulinsekretion blockiert (80, 81, 82).

4.1.2.4 Einfluß des Adenylatcyclasesystems

Das Adenylatcyclasesystem ist an der glucosestimulierten Insulinfreisetzung erwachsener Ratten beteiligt (83, 84, 85, 86). So führt eine Erhöhung der insulären Konzentration von cAMP, sei es durch Stimulation der Adenylatcyclase oder durch Hemmung der Phosphodiesterase, in Inseln erwachsener Ratten, insbesondere bei Anwesenheit von Glucose, zu einer Steigerung der Insulinsekretion. In Langerhansschen Inseln kann ein Anstieg des cAMP z.B. durch Glucose, Glucagon, Isoproterenol, Prostaglandine und Tolbutamid erreicht werden (86, 87, 88). Eine Potenzierung der glucoseinduzierten Insulinsekretion ist durch Coffein, Theophyllin und Isobutylmethylxanthin möglich (22, 89, 90).

Auch bei Inseln von fötalen und neugeborenen Ratten führt

eine Stimulierung des Adenylatcyclasesystems z.B. durch die Phosphodiesterase-Hemmstoffe Theophyllin und Coffein, zu einer Sekretion von Insulin (66, 91, 92). Heinze und Steinke (66) stellten fest, daß Theophyllin in Abwesenheit von Glucose die Sekretion von Insulin zwar nur wenig stimuliert, in Anwesenheit von Glucose (16,7 mM) aber ein deutlicher Anstieg der Insulinsekretion bei Föten, Neugeborenen und Erwachsenen schon nach Zusatz von 1 mM Theophyllin zu beobachten ist. Durch 10 mM Theophyllin läßt sich allerdings keine weitere Steigerung der glucoseinduzierten Insulinsekretion erreichen. Von Lambert et al. (93) wurde nachgewiesen, daß Coffein in Abwesenheit von Glucose in vitro die Insulinfreisetzung des fötalen Rattenpankreas steigern kann.

Grasso et al. (94) zeigten an frühgeborenen Kindern, daß Theophyllin (0,5 mg/min) und Glucagon (0,4 γ/min), wenn sie gleichzeitig infundiert werden, eine wesentlich größere Sekretion von Insulin hervorrufen, als wenn sie einzeln verabreicht werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß Theophyllin durch Hemmung der Phosphodiesterase zu einer Akkumulation von cAMP in der B-Zelle führt, das letztlich den Sekretionsmechanismus für Insulin aktiviert und das Glucagon, als Aktivator der Adenylat cyclase, diesen Effekt verstärkt. In diesen in vivo Versuchen ist Glucose selbstverständlich in physiologischer Konzentration vorhanden. Einige Autoren vermuten, daß die geringe Effizienz der Glucose in Föten im Vergleich mit Erwachsenen hinsichtlich der Insulinsekretion, durch eine zu geringe Menge an cAMP in

der B-Zelle verursacht wird (95, 96). Ein zu geringer cAMP-Gehalt in Inseln von Föten im Vergleich zu Erwachsenen konnte jedoch von Mintz et al. (97) bei Ratten nicht bestätigt werden. Vermutlich wird die Reifung der fötalen Inseln hinsichtlich der Sekretion von Insulin nicht durch Veränderungen im Adenylatcyclasesystem bedingt.

Vergleicht man die Insulinfreisetzung durch Theophyllin und Coffein in Inseln von Föten quantitativ mit der in Erwachsenen, so liegt selbst bei Berücksichtigung der Größenverhältnisse der Langerhansschen Inseln die Insulinfreisetzung in fötalen Inseln um das vier- bis fünffache niedriger als bei erwachsenen Ratten.

4.1.2.5 Einfluß von Aminosäuren und Sulfonylharnstoffen

Aminosäuren, davon insbesondere Leucin und Arginin, sind sowohl in vivo als auch in vitro in der Lage, die Sekretion von Insulin aus der B-Zelle von Inseln erwachsener Ratten zu stimulieren (98, 99, 100). Dabei setzen Leucin und Arginin nicht nur in Abwesenheit von Glucose Insulin frei, sondern sie verstärken auch die durch Glucose induzierte Insulinsekretion.

Auch bei Föten und Neugeborenen (2. und 5. Tag p.p.) führen Argenin und Leucin (91, 101, 102) zu einer gesteigerten Freisetzung von Insulin. Allerdings sind die freigesetzten Insulinmengen um ein vielfaches niedriger als in erwachsenen Tieren.

Beim perfundierten Rattenpankreas von erwachsenen Ratten führen Sulfonylharnstoffe nur zu einem ersten Peak der Insulinsekretion. Erst bei hohen Glucosekonzentrationen (16,7 mM) führen Sulfonylharnstoffe zu einer ausgeprägten zweiten Phase der Insulinsekretion und damit zu einer deutlichen Steigerung der Freisetzung von Insulin aus der B-Zelle

Am fötalen Pankreas bewirkt Tolbutamid in Abwesenheit von Glucose in vitro (Organkultur) nur eine sehr geringe Insulinfreisetzung. Wesentlich effektiver wirkt Tolbutamid in Anwesenheit von 11 mM Glucose oder auch 10 mM Coffein (91). Allerdings liegen die freigesetzten Insulinmengen niedrig im Vergleich zum Pankreas von Erwachsenen.

Glibenclamid (103) führt sowohl in vivo als auch in vitro in Anwesenheit von Glucose zu einer Stimulierung der Insulinsekretion in Inseln von fötalen Ratten. Die gemessene Insulinfreisetzung liegt aber um das dreifache niedriger als in Inseln von erwachsenen Ratten. Dies gilt auch für die Wirkung des Glibenclamids in Perifusionsversuchen, mit deren Hilfe die Dynamik (103) der Insulinsekretion untersucht wird. Während Glucose in Föten (16,7 mM) nur zu einem ersten Peak der Insulinsekretion führt und der zweite Peak bestenfalls sehr schwach ausgeprägt ist, bewirkt Glibenclamid (1 µg/ml) in Anwesenheit von Glucose (16,7 mM) zusätzlich eine deutlich ausgeprägte zweite Phase, die aber deutlich unter dem Niveau von Erwachsenen liegt.

4.2 DNA-Gehalt der Langerhansschen Inseln

Um die Versuchsergebnisse richtig beurteilen zu können, muß man der unterschiedlichen Größe der Langerhansschen Inseln gerecht werden. Denn eine größere Insel besitzt mehr Zellen und verfügt damit auch über eine größere Sekretionsleistung, als eine vergleichbare kleinere Insel. Die unterschiedlichen Versuchsergebnisse könnten daher auch nur auf den Größenunterschieden zwischen den Inseln von trächtigen, neugeborenen und fötalen Ratten beruhen. Da eine genaue Volumenbestimmung einer einzelnen Insel äußerst schwierig ist, hat man nach Parametern gesucht, die wenigstens annähernd in Korrelation zur Inselgröße stehen. Als geeignete Bezugsgrößen haben sich das Trockengewicht (44, 141), der Proteingehalt (142), der DNA-Gehalt (45) und das Vermessen der Inseln unter dem Mikroskop (142) erwiesen. Da der DNA-Gehalt einer Zelle als recht konstanter Faktor angesehen wird, kann man in etwa auf die Anzahl Zellen und damit auf die Größe der Insel und ihre Leistungsfähigkeit schließen. Außerdem ist die Bestimmungsmethode relativ schnell durchzuführen. Mit Erfolg anwenden kann man diese Methode allerdings nur dann, wenn die DNA-Bestimmung an den Inseln durchgeführt wird, die im Versuch auch tatsächlich eingesetzt werden. Der DNA-Gehalt muß also entweder von jeder einzelnen Insel oder von jeder Versuchseinheit (5 Inseln) bestimmt werden. Nur dann kann jedem Meßwert auch ein entsprechender DNA-Wert

zugeordnet werden. Dies wird sich auch positiv durch eine niedrigere Streuung der Versuchsergebnisse bemerkbar machen. In den wenigsten Fällen kann man jedoch so verfahren, weil die Inseln im Versuch verbraucht werden und auch bei den hier beschriebenen Versuchen mußte man darauf verzichten, die radioaktiv kontaminierten Inseln nach Messung der Glucoseoxidation einer DNA-Bestimmung zu unterziehen. In diesen Fällen und auch dann, wenn mit vergleichbarem Tiermaterial, also z.B. nur fötalen oder nur neugeborenen Inseln gearbeitet wird, ist der Bezug der Ergebnisse auf 'pro Insel' bei Randomisierung und genügend hoher Anzahl an Inseln, vermutlich ausreichend und, bei lebenden Inseln sehr wichtig, sicher der schnellste Weg. Ist das Tier bzw. Inselmaterial jedoch nicht vergleichbar, wie z.B. bei Inseln von trächtigen und fötalen Ratten, so ist die DNA-Bestimmung insofern praktikabel, daß man einen mittleren DNA-Gehalt der Inseln von fötalen, neugeborenen und trächtigen Ratten separat bestimmt, von Inseln, die im eigentlichen Versuch gar nicht eingesetzt werden.

Wir haben aus diesem Grunde den DNA-Gehalt der Inseln von trächtigen, neugeborenen (5.Tag p.p.) und fötalen (21.Tag p.c.) Ratten bestimmt, in der Absicht die Ergebnisse der Pentosephosphatshunt-Berechnung auf die Inselgröße beziehen zu können. Zum Vergleich wurde auch der DNA-Gehalt von Inseln normaler erwachsener Ratten im Alter von drei Monaten bestimmt. Dabei zeigte sich, daß der DNA-Gehalt von trächtigen und drei Monate alten erwachsenen Ratten

nicht identisch ist. Trächtige Ratten weisen einen um 26% höheren DNA-Gehalt in ihren Inseln auf als die erwachsenen, während die Inseln fötaler Ratten 39% weniger DNA als diese enthalten. Dies ist nicht unrealistisch, da fötale Inseln auch kleiner sind als die von Erwachsenen. Der DNA-Gehalt entspricht auch einem groben optischen Vergleich der Inseln unter dem Stereomikroskop.

Nicht in diese Vorstellung paßt allerdings der DNA-Gehalt der Inseln von neugeborenen Ratten am 5.Tag p.p., die 84% mehr DNA pro Insel enthalten als die Erwachsenen und sogar noch wesentlich mehr DNA besitzen als trächtige Ratten und daß, obwohl bei einem Größenvergleich die Inseln von neugeborenen Ratten eher kleiner, auf keinen Fall aber größer als die Inseln von erwachsenen Tieren erscheinen. Es mag an dieser Stelle offen bleiben, ob diese Befunde letztlich dadurch zustande kommen, daß sich in dieser Lebensphase eine größere Anzahl von Zellen in Teilung befindet. Jedenfalls haben uns diese Befunde veranlaßt, von einer Umrechnung der Glucoseoxidation von der Anzahl der Inseln auf deren DNA-Gehalt Abstand zu nehmen.
Wenn es dadurch auch nicht möglich ist, quantitative Vergleiche hinsichtlich der oxidierten Glucosemenge bei den verschiedenen verwendeten Glucosekonzentrationen zwischen den Inseln von Müttern, Neugeborenen und Föten anzustellen, so lassen unsere Befunde dennoch eine Aussage darüber zu, ob die Oxidation der Glucose über die aerobe Glykolyse

bzw. den PPS in Korrelation zur verwendeten Glucosekonzentration steht.

4.3 Glucoseoxidation in Langerhansschen Inseln

Der Stoffwechsel der Glucose könnte für die Sekretion von Insulin mindestens von dreifacher Bedeutung sein.

1. Er könnte falls die Metabolismus-Theorie stimmt, einen Metaboliten vorwiegend auf dem Abbauweg über die Glykolyse im Bereich der Triosen liefern, der das eigentliche quantitative Signal für die Sekretion von Insulin gibt. Für diese Theorie sprechen folgende Befunde:

a) Die Aktivität des glykolytischen Abbaus korreliert mit der durch Glucose induzierten Insulinfreisetzung (10).

b) Eine Insulinsekretion bleibt aus, sobald die Glykolyse gehemmt wird, z.B. mit 2-Desoxyglucose (14, 15, 16) und Mannoheptulose (104, 105).

c) Jodacetat hemmt die glucoseinduzierte Insulinsekretion. Es verhindert die Bildung von 1,3-Diphosphoglycerat durch Hemmung der Glycerinaldehyd-Dehydrogenase (20), auch dann, wenn die durch Jodacetat gestörte Energieversorgung der B-Zelle durch Zusatz von Pyruvat, welches für eine ausreichende ATP-Produktion sorgt, ohne selbst die Insulinsekretion zu beeinflussen, gesichert ist (17,18)

d) Metaboliten der Glucose, wie z.B. D-Glycerinaldehyd und 1,3-Dihydroxyaceton führen zu einer Sekretion von Insulin. Vermutlich werden sie nach Phosphorylierung in der B-Zelle als Triose-Phosphat in die Glykolyse eingeschleußt (80, 81).

e) Viele Zucker, die im Pentosephosphatstoffwechsel und in der Glykolyse in Metaboliten der Glucose umgewandelt werden, können eine Insulinsekretion hervorrufen (80, 106, 107, 108).

Die Gründe, die dagegen für eine Glucorezeptor-Theorie sprechen, werden in dieser Arbeit nicht abgehandelt.

2. Der glykolytische Abbau der Glucose und ihre Oxidation im Krebszyklus liefern die für die Sekretion von Insulin notwendige Energie in Form von ATP.
3. Die Oxidation der Glucose über den PPS ist erforderlich, um das für die Sekretion von Insulin benötigte NADPH und GSH, wie später noch im Detail ausgeführt wird, bereitzustellen.

Wie im Kapitel 2.10.1 Seite 24 bereits beschrieben ist, wird durch die Bestimmung der Glucoseutilisation sowohl der Glucoseabbau über die Glykolyse als auch über den PPS erfaßt. Dabei entspricht ein Molekül THO einem Molekül Glucose, denn im PPS wird entweder nur Glycerinaldehyd-3-phosphat oder nur Fructose-6-phosphat aus einem Molekül Glucose gebildet. Bei der Bestimmung von $^{14}CO_2$ aus der Oxidation 6-^{14}C markierter Glucose entstammt das radioaktive CO_2 im wesent-

lichen dem Abbau der Glucose über die Glykolyse und den Krebszyklus. Man wird also durch die Bestimmung des $^{14}CO_2$ aus 6-^{14}C-Glucose ein Indiz für das Ausmaß der aeroben Oxidation von Glucose erhalten.

Anders liegen die Verhältnisse bei der Bildung von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Glucose. Diese $^{14}CO_2$-Bildung stammt sowohl aus den ersten Schritten der Oxidation im PPS als auch aus der aeroben Oxidation der Glucose. Man findet daher beim Vergleich der $^{14}CO_2$-Bildung aus äquimolaren Mengen von 1-^{14}C- und 6-^{14}C-Glucose bei der Oxidation der Glucose immer höhere 1-^{14}C-Werte als 6-^{14}C-Werte. Dies gilt auch für Inselgewebe (9, 25).

Von Katz und Wood (36) wurde unter Zuhilfenahme der THO-Bildung sowie der $^{14}CO_2$-Bildung aus 1-^{14}C- und 6-^{14}C-Glucose eine Formel aufgestellt, mit der es annähernd möglich ist, sowohl die prozentuale als auch die absolute Rate der Glucoseoxidation über den Pentosephosphatshunt zu ermitteln.

Die Bedeutung des Pentosephosphatshunts für die glucoseinduzierte Insulinsekretion isolierter Langerhansscher Inseln ist umschritten. Daß der PPS in anderen endokrinen Organen und verschiedenen Geweben eine wichtige Funktion hat, ist jedoch erwiesen. Der Anteil des PPS an der Glucoseutilisation beträgt z.B. im Lungengewebe 11-12% (109), im Milchdrüsengewebe 20-30% (110) und in den Erythrocyten 30-40% (111). In der B-Zelle wird Glucose sowohl über die Glykolyse als auch über den PPS abgebaut (10, 11, 12), der

aber sicherlich,wie in anderen Geweben auch, nur einen kleineren Anteil am Glucoseabbau hat. Nach Befunden von Verspohl et al.(25) beträgt der prozentuale Anteil des PPS unter maximaler Glucosestimulation ca. 9%.
Es gibt jedoch eine ganze Reihe von Beobachtungen, die vermuten lassen, daß die Funktion des PPS einen wesentlichen Einfluß auf die glucoseinduzierte Insulinsekretion ausübt. So steigt in Langerhansschen Inseln während der Stimulation der Insulinsekretion durch Glucose der Gehalt an 6-Phosphogluconat (112) und Glucose-6-phosphat. Wie Verspohl et al. (25) zeigten ist auch der Pentosephosphatshunt durch Erhöhung der Glucosekonzentration stimulierbar. Eine Insulinfreisetzung erfolgt außerdem nach Gabe von Pentosen, wie z.B. Ribose oder den Alkoholen Xylitol und Ribitol (113). Pentosen werden nicht über die Glykolyse sondern über den PPS abgebaut (114). Ammon und Steinke (21, 22) fanden, daß in Langerhansschen Inseln eine Hemmung des PPS durch 6-Aminonicotinamid (6-AN) einem Antimetaboliten der Pyridinnukleotidsynthese (115, 116), gleichzeitig eine Hemmung der glucoseinduzierten Sekretion von Insulin zur Folge hat. Daher könnte der PPS vielleicht doch eine Bedeutung für die Insulinfreisetzung haben.

4.3.1 Glucoseoxidation über die Glykolyse

Wie aus den Abbildungen (Seite 55 - 57) ersichtlich, führt bei den Inseln von Müttern und Neugeborenen eine Erhöhung der Glucosekonzentration von 5,6 auf 16,7 mM zu einem deutlichen Anstieg der CO_2-Bildung aus 6-^{14}C-Glucose. Diese Befunde sprechen dafür, daß es sowohl bei den Inseln von trächtigen als auch von neugeborenen (5.Tag p.p.) Ratten, die bereits befähigt sind Insulin auf einen Stimulus zu sezernieren, eine von der Glucosekonzentration abhängige aerobe Oxidation der Glucose stattfindet. Diese Befunde stehen mit denen anderer Autoren in Einklang, die ebenfalls an Inseln von erwachsenen Ratten bzw. Mäusen eine von der Glucosekonzentration abhängige CO_2-Produktion aus 6-^{14}C-Glucose beobachteten (11, 25).

Ein gegensätzliches Verhalten zeigen die Inseln von fötalen Ratten (21.Tag p.c.). Hier findet sich bei Steigerung der Glucosekonzentration von 5,6 auf 16,7 mM keine Zunahme der CO_2-Bildung aus 6-^{14}C-Glucose. Diese Befunde legen es nahe, daß bei fötalen Inseln eine Erhöhung der Glucosekonzentration nicht zu einer Steigerung der aeroben Glucoseoxidation führt.

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß die aerobe Oxidation der Glucose für die Insulinsekretion in folgenden Punkten von Bedeutung sein könnte:

1. Bildung eines Signalmetaboliten
2. Bildung von ATP, welches die für den Sekretionsvorgang

notwendige Energie bereitstellt.
Wenn dies richtig ist, so kann bereits jetzt gesagt werden, daß einer der Gründe für die fehlende oder quantitativ doch geringfügige Sekretion von Insulin bei fötalen Ratten darin bestehen könnte, daß die Bildung des vermutlich für die Sekretion von Insulin wichtigen Signalmetaboliten unterbleibt bzw. daß es nicht zu einer adäquaten Energieproduktion kommt. Zur Untermauerung dieser Vorstellung wäre es notwendig, die Konzentration der von anderen als wichtig angesehenen Signalmetaboliten bzw. das ATP zu bestimmen. Unterstützt wird unsere Beobachtung, nach der bei fötalen Inseln die aerobe Glykolyse herabgesetzt ist, durch Befunde , nach denen die Phosphorylierung der Glucose in den Inseln fötaler Ratten deutlich geringer ist, als bei Inseln von erwachsenen Ratten (78).

4.3.2 Glucoseoxidation über den PPS

Die Befunde dieser Arbeit über den PPS stimmen mit denen von Verspohl et al.(25) überein, nach denen es bei Erhöhung der Glucosekonzentration bei Inseln von erwachsenen Ratten sowohl zu einer Zunahme des prozentualen Anteils des PPS, gemessen an der Gesamtoxidation als auch zu einer Zunahme der absoluten Menge an Glucose, die über den PPS verstoffwechselt wird, kommt.
Ähnliche Ergebnisse zeigten sich an den Inseln von 5 Tage

alten neugeborenen Ratten, die bereits die Fähigkeit zu einer glucoseinduzierten Insulinsekretion besitzen. Auch Heinze und Steinke (9) fanden bei Verwendung von 16,7 mM Glucose bei den Inseln von 5 Tage alten Neugeborenen ein hohes Verhälnis der $^{14}CO_2$-Bildung aus der Oxidation von 1-^{14}C- zu 6-^{14}C-Glucose. Die Autoren schlossen daher, ohne allerdings darüber quantitative Angaben machen zu können, daß schon am 5. Tage nach der Geburt die Aktivität des PPS in den Inseln von neugeborenen Ratten annähernd so hoch ist wie in den Inseln von Müttern und die Autoren vermuteten damals, daß dies ein Grund sein könnte, warum nach dem zweiten Tag post partum die Sekretion von Insulin in Gang kommt.

Ganz anders verhalten sich dagegen die Inseln fötaler Ratten, bei denen die Erhöhung der Glucosekonzentration weder zu einer Zunahme der absoluten Rate noch des prozentualen Anteils des PPS an der Glucoseoxidation führt. Auch diese Befunde stehen in Einklang mit den Beobachtungen von Heinze und Steinke, wobei jene allerdings den PPS nicht quantitativ ermitteln konnten, sondern sich lediglich auf die Feststellung beschränkten, daß das Verhältnis der $^{14}CO_2$-Bildung aus 1-^{14}C- und 6-^{14}C-Glucose in Gegenwart von 16,7 mM Glucose etwa gleich 1 ist und daher in den Inseln von fötalen Ratten nicht mit einer meßbaren Aktivität des PPS zu rechnen ist. Die Autoren äußerten deshalb die Vermutung, daß wegen des Fehlens des PPS die Sekretion von Insulin in den Inseln fötaler Ratten nicht in Gang gesetzt werden kann.

Auf Grund der von uns erhobenen Befunde, nach denen im Gegensatz zu erwachsenen und 5 Tage alten neugeborenen Ratten die Aktivität des PPS in Inseln von Föten (21.p.c.) durch Erhöhung der Glucosekonzentration nicht gesteigert werden kann, legt ebenfalls die Vermutung nahe, daß zusätzlich zu dem vorher erwähnten Fehlen der Signalmetabolite aus der Glykolyse oder des Fehlens an Energie, auch wegen der nicht steigerbaren Aktivität des PPS die Sekretion von Insulin nicht in Gang gesetz werden kann. Alles, die Glucoseoxidation über die aerobe Glykolyse, über den PPS und die Stimulierbarkeit der Insulinsekretion durch Glucose, setzt offenbar erst einige Tage nach der Geburt ein und ist nach unseren Befunden am 5.Tag nach der Geburt ähnlich entwickelt wie bei Erwachsenen.

4.3.3 Bedeutung des PPS für die Insulinsekretion

Es erhebt sich nun die Frage, welche Funktion der PPS für die Insulinsekretion hat, denn es kann das Fehlen dieser Funktion sein, die bei fötalen Ratten die Stimulierbarkeit der Insulinsekretion nicht zuläßt.
Wichtige Hinweise für die Bedeutung des PPS liefert die Beeinflussung des NADPH/NADP-Systems. Durch Glucose wird dosisabhängig eine Erhöhung des NADPH/NADP-Quotienten erzielt, dessen Höhe in Korrelation zur freigesetzten Insulinmenge (23) steht. Unter den Bedingungen des Hungers ist die glu-

coseinduzierte Insulinfreisetzung vermindert und man beobachtet gleichzeitig eine nur geringe Zunahme des NADPH/NADP-Quotienten (117). Bei Zusatz von Methylenblau, einem Oxidationsmittel für NADPH, zum Inkubationsmedium, erfolgt konzentrationsabhängig eine Verringerung des NADPH/NADP-Quotienten und gleichzeitig eine Verminderung der durch Glucose stimulierbaren Insulinfreisetzung (24, 118, 119).

Auch fand sich auf Grund einer Feedbackhemmung ein erniedrigter NADPH/NADP-Quotient durch Zusatz von exogenem Insulin zum Inkubationsmedium (119, 120). Während in Inseln von erwachsenen Ratten nach einer Glucosestimulation der NADPH-Gehalt ansteigt, zeigen fötale Inseln am 21,5.Tag p.c. keinen Anstieg des NADPH/NADP-Quotienten (121). Sowohl der NADPH- als auch der NADP-Gehalt bleiben unverändert. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit obigen Befunden, nach denen eine Erhöhung der Glucosekonzentration nicht zu einem Anstieg der Aktivität des PPS führt. Es besteht also offensichtlich ein gewisser Zusammenhang zwischen PPS, NADPH, NADP und Insulinsekretion, wobei der PPS im wesentlichen wohl die Aufgabe hat, genügend NADPH bereitzustellen (122, 123).

Der Redoxzustand membranständiger SH-Gruppen wird vermutlich durch den GSH/GSSG-Quotienten reguliert, letzterer steht im Gleichgewicht mit dem NADPH/NADP-Quotienten. Es ist nämlich bekannt, daß Thiolreagenzien, die Zellwände permeieren und intrazellulär zur Oxidation von Thiolgruppen, insbesondere von reduziertem Glutathion führen, eine Hemmung der durch

Glucose oder Sulfonylharnstoffe bedingten Insulinfreisetzung bewirken. Andererseits wird durch solche Thiolreagenzien wie p-Chlormercuribenzoat, welche die Zellmembran praktisch nicht durchdringen können, die Insulinsekretion stimuliert (124, 125). Diese Wirkung wird vermutlich durch eine Reaktion mit membranständigen SH-Gruppen der B-Zelle ausgelöst.

Schon Douglas et al. (126) und Schofield (127) beschreiben, daß SH-Gruppen bei Sekretionsprozessen von Hormonen wesentlich beteiligt sein könnten. Weitere Hinweise lieferten Hellman et al. (128) und Ammon et al. (118, 129), die feststellten, daß Glucose sowohl den Gehalt an reduziertem Glutathion in der Pankreasinsel als auch die Insulinsekretion steigert. Dagegen verursacht Insulin selbst, einen Abfall der intrazellulären GSH-Konzentration und eine Hemmung seiner eigenen Sekretion. Die exogene Zufuhr von GSH am isolierten perfundierten Rattenpankreas potenziert die durch Glucose oder Tolbutamid induzierte Insulinfreisetzung. In Abwesenheit von Glucose und Tolbutamid hat GSH keine Wirkung. So spricht vieles für die Annahme, daß die Empfindlichkeit der B-Zelle in Bezug auf die insulinfreisetzende Wirkung verschiedener Stimulantien, wie Glucose und Tolbutamid, über den Redoxzustand des Glutathionsystems und der SH-Gruppen der Membran reguliert wird. Eine Verschiebung des GSH/GSSG-Gleichgewichtes zur reduzierten Seite führt zu einer vermehrten Bildung freier membranständiger SH-Gruppen, was letztlich über sterische Änderungen der Membranstruktur

zu einer veränderten Ionenpermeabilität und zur Insulinsekretion führen könnte.

Die Reduktion von GSSG durch die Glutathionreduktase findet im Cytosol statt, und Untersuchungen an Pankreasinseln zeigen, daß auch der NADPH/NADP-Quotient im Cytosol durch Glucoseabgabe stärker beeinflußt wird als in den Mitochondrien (130). Die Aktivität von Glutathionreduktase ist in Inseln vergleichsweise größer als im exokrinen Pankreas oder in der Leber (131). Als Kofaktor für die Glutathionreduktase ist das NADPH wichtiger als das NADH, weil nur durch NADPH die Enzymaktivität der Glutathionreduktase wesentlich erhöht werden kann (132). So besteht die Vermutung, daß insbesondere das im PPS gebildete NADPH zur Reduktion von GSSG benötigt wird. Methylenblau, t-BHP und Diamid erniedrigen den durch Glucose bedingten GSH-Gehalt in der Langerhansschen Insel und senken den GSH/GSSG-Quotienten (133). Gleichzeitig kommt es durch solche Hemmstoffe, wie Diamid, welches GSH und andere Thiole aufoxidiert (134, 135, 136), und t-BHP, das als Substrat (137, 138) für die Glutathionperoxidase dient, zu einer Hemmung der glucoseinduzierten Insulinsekretion. Auch DIP, eine Azodicarbonsäureverbindung (139, 140), die intrazellulär GSH zu GSSG oxidiert, erniedrigt die glucoseabhängige Insulinfreisetzung. Wandelt man DIP in eine Substanz um, die auf Grund ihrer hydrophilen Eigenschaften DIP+2, die Plasmamembran nicht permeieren kann, so ist weder der GSH/GSSG-Quotient erniedrigt, noch die Insulinsekretion gehemmt (140). Beim Vergleich der GSH/GSSG-Quotienten von

Setzen wir Daten von Neugeborenen und Erwachsenen wird deutlich, daß Föten nicht in der Lage sind, auf Glucosereiz mit einem Anstieg des GSH/GSSG-Quotienten zu reagieren, während dies Neugeborene und Erwachsene sehr wohl tun (143).

Die Befunde zur Glucoseoxidation lassen folgende Schlußfolgerungen zu:

1. Berücksichtigt man die Tatsache, daß bei Inseln fötaler Ratten die Oxidation der 6-^{14}C-Glucose auf Glucosereiz nicht gesteigert werden kann, so könnte ein Grund für die bei fötalen Inseln nicht vorhandene oder sehr geringe Sekretion von Insulin nach Glucosestimulation darin zu sehen sein, daß ein oder mehrere im Verlauf des glykolytischen Abbaus entstehende Signalmetaboliten nicht in genügender Menge gebildet werden und andererseits die für die Sekretion von Insulin erforderliche Energieproduktion nicht möglich ist.

2. Faßt man die an Föten gewonnenen Ergebnisse zur Aktivität des PPS, des Redoxzustandes des NADPH/NADP und GSH/GSSG Systems zusammen, so drängt sich der Gedanke auf, daß die im fötalen Alter fehlende Stimulation der Insulinsekretion mindestens zum Teil ihre Ursache auch darin haben kann, daß wegen des Fehlens der durch Glucose stimulierbaren Aktivität des PPS die Bildung von NADPH und GSH vermindert ist, was letztlich, wie schon

erwähnt, zu einer geringeren Empfindlichkeit der B-Zelle gegenüber stimulierenden Reizen der Insulinsekretion führt.

In diesen Gedankengang könnte man auch die Befunde, nach denen bei fötalen Inseln nicht nur die durch Glucose, sondern auch die durch Sulfonylharnstoffe, Aminosäuren, Glucagon und Methylxanthinen stimulierbare Insulinsekretion, welche vom NADPH abhängig ist, gegenüber Inseln von Erwachsenen deutlich herabgesetzt ist, einordnen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

5.1 Fragestellung

An Inseln von trächtigen Ratten, 5 Tage alten neugeborenen und fötalen Ratten am 21. Tag p.c. wurde der Einfluß verschiedender Glucosekonzentrationen auf die Glucoseutilisation, die 1-^{14}C- und 6-^{14}C-Glucoseoxidation, sowie den prozentualen Anteil und die absolute Rate des Pentosephosphatshunts an der Glucoseoxidation bestimmt. Für die genannten Inseln wurde auch der mittlere DNA-Gehalt ermittelt.
Die Untersuchung sollte zur Klärung der Frage beitragen, warum die Sekretion von Insulin bei Inseln von fötalen Ratten im Gegensatz zu fünf Tage alten neugeborenen und erwachsenen Ratten, durch Stimulation mit Glucose und anderen Stimulatoren der Insulinsekretion nicht in Gang gesetzt werden kann.

5.2 Ergebnisse

Die Inseln trächtiger Ratten enthalten etwa 26% mehr DNA/Insel als die Inseln von Erwachsenen.

Der DNA-Gehalt fötaler Inseln liegt 39% unter dem der Erwachsenen.
Inseln fünf Tage alter Ratten weisen einen um 84% höheren DNA-Gehalt je Insel auf als Erwachsene und verfügen somit auch über mehr DNA/Insel als trächtige Ratten.

Bei Inseln trächtiger und fünf Tage alter Ratten führt die Erhöhung der Glucosekonzentration von 5,6 auf 16,7 mM zu einer Zunahme der 6-^{14}C-Glucoseoxidation.
Die Inseln fötaler Ratten zeigen eine solche Steigerung der Glucoseoxidation nicht.

Bei Inseln von schwangeren und neugeborenen Ratten führt die Erhöhung der Glucosekonzentration von 5,6 auf 16,7 mM zu einem signifikanten Anstieg der 1-^{14}C-Glucoseoxidation, der in beiden Fällen etwa gleich stark ist.
Bei Inseln fötaler Ratten ist ein solcher Anstieg nicht zu beobachten.

Bei den Inseln von trächtigen, neugeborenen und fötalen Ratten beträgt der prozentuale Anteil des PPS an der Glucoseoxidation in Gegenwart von 5,6 mM Glucose 1,8% bzw. 1,8% bzw. 0,12%.
Bei Erhöhung der Glucosekonzentration auf 16,7 mM steigt der prozentuale Anteil des PPS der Mütter auf 7,7%, der Neugeborenen auf 5,5% und der Föten auf 1,2%.
Bei den Inseln fötaler Ratten ist kein signifikanter An-

stieg des prozentualen Anteils des PPS zu beobachten.

Ähnliche Befunde ergaben sich bei der Berechnung der absoluten Rate der Glucoseoxidation über den PPS.
Bei Inseln von trächtigen, neugeborenen und fötalen Ratten beträgt die absolute Rate der Glucoseoxidation über den PPS in Gegenwart von 5,6 mM Glucose 3,9 bzw. 5,5 bzw. 1,9 pmol/90 min/5 Inseln.
Bei Erhöhung der Glucosekonzentration auf 16,7 mM steigt die absolute Rate der Glucoseoxidation über den PPS bei trächtigen Ratten auf 24,7 und bei Neugeborenen auf 23,4 pmol/ 90 min/5 Inseln.
Keine signifikante Steigerung der absoluten Rate des PPS findet sich dagegen bei Inseln fötaler Ratten.

5.3 Schlußfolgerungen

1. Die bei Neugeborenen (5.Tag p.p.) erheblich höheren DNA-Gehalte sind möglicherweise in Zusammenhang mit einer erhöhten Teilungsrate der Zellen zu sehen. Da es in dieser Arbeit nicht möglich war, die DNA-Gehalte mit der Inselgröße zu korrelieren und selbst die DNA-Gehalte der nicht trächtigen von denen der trächtigen Ratten abwichen, wurde darauf verzichtet die Befunde der Glucoseoxidation auf DNA-Basis auszuwerten.

2. Unsere Befunde, nach denen sich bei Inseln fötaler Ratten weder die Oxidation 6-^{14}C noch 1-^{14}C markierter Glucose durch Glucose steigern läßt, sprechen dafür, daß Inseln fötaler Ratten nicht in der Lage sind einen möglichen Signalmetaboliten für die Insulinsekretion, der dem Glucosestoffwechsel entstammt, zu bilden.
   Fötale Inseln sind vermutlich nicht in der Lage bei Erhöhung der Glucosekonzentration mit einer verstärkten Energieproduktion, wie sie zur Insulinsekretion notwendig ist, zu reagieren.

3. Auch soweit der PPS eine Funktion im Mechanismus der Insulinsekretion besitzt, entfällt diese in Inseln fötaler Ratten (21.Tag p.c.) und könnte damit einen zweiten Faktor für das Fehlen der glucosebedingten Stimulierbarkeit der Insulinsekretion darstellen.

6 ANHANG

Ergebnisse tabellarisch

Tabelle: Einfluß von Glucose auf die Aktivität des PPS in isolierten Langerhansschen Inseln der trächtigen Ratte bei Inkubation von 5 Inseln in 1 ml KRB-Albumin Puffer während 90 Min. unter Zusatz von 5,6; 11,1 oder 16,7 mM Glucose und von Insulinantiserum um 1000 µE IRI zu binden. Gemessen wurde die Glucoseoxidation entweder von 1-^{14}C- oder 6-^{14}C-Glucose sowie die Glucoseutilisation von 5-^{3}H-Glucose. Der Betrag des 'specific yield' von $^{14}CO_2$, der Prozentsatz des PPS und die absolute Rate der Glucoseoxidation über den PPS wurden errechnet.
Mittelwerte ± SEM; Anzahl der Versuche in Klammern;
* = P < 0,05; **= P < 0,01 ***= P < 0,001 vs 5,6 u./od. 11,1 mM Glucose

	Glucose (mM)		
TRÄCHTIGE RATTEN	5,6	11,1	16,7
1-^{14}C-Glucoseoxidation (pmol/90 min/5 Inseln)	20,24 ± 6,19 (23)	62,91 ± 8,26*** (23)	85,26 ± 13,00*** (19)
6-^{14}C-Glucoseoxidation (pmol/90 min/5 Inseln)	7,00 ± 1,81 (27)	33,43 ± 7,91** (23)	35,35 ± 7,5*** (21)
Glucoseutilisation (Bildung von THO aus 5-^{3}H-Glucose in pmol/90 min/5 Inseln)	219,8 ± 61,89 (11)	353,1 ± 67,7 (10)	321,0 ± 67,09 (12)
Specific yield von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Glucose	0,092 ± 0,028 (23)	0,170 ± 0,023* (22)	0,265 ± 0,040*** (19)
Specific yield von $^{14}CO_2$ aus 6-^{14}C-Glucose	0,031 ± 0,008 (26)	0,101 ± 0,024 (21)	0,110 ± 0,023** (21)
Pentose Phosphat Shunt (%)	1,79 ± 0,87 (14)	3,31 ± 0,82 (11)	7,71 ± 1,76** (12)
Absolute Rate der Glucoseoxidation über den PPS (pmol/90 min/5 Inseln)	3,92 ± 1,91 (14)	11,62 ± 2,88* (11)	24,75 ± 5,66** (12)

Tab.2: Einfluß von Glucose auf die Aktivität des PPS in isolierten Langerhansschen Inseln der neugeborenen Ratte bei Inkubation von 5 Inseln in 1 ml KRB-Albumin Puffer während 90 Min. unter Zusatz von 5,6; 11,1 oder 16,7 mM Glucose und von Insulinantiserum um 1000 μE IRI zu binden. Gemessen wurde die Glucoseoxidation entweder von 1-^{14}C- oder 6-^{14}C-Glucose sowie die Glucoseutilisation von 5-^{3}H-Glucose. Der Betrag des 'specific yield' von $^{14}CO_2$, der Prozentsatz des PPS und die absolute Rate der Glucoseoxidation über den PPS wurden errechnet.
Mittelwerte ± SEM; Anzahl der Versuche in Klammern;
*= P < 0,05; ***= P < 0,01 ***= P < 0,001 vs 5,6 u./od. 11,1 mM Glucose

	Glucose (mM)		
Neugeborene (5.Tag p.p.)	5,6	11,1	16,7
1-^{14}C-Glucoseoxidation (pmol/90 min/5 Inseln)	29,54 ± 5,19 (21)	43,34 ± 12,84 (23)	88,73 ± 16,69 ** (19)
6-^{14}C-Glucoseoxidation (pmol/90 min/5 Inseln)	15,93 ± 3,33 (21)	22,50 ± 4,43 (24)	30,65 ± 7,50 (19)
Glucoseutilisation (Bildung von THO aus 5-^{3}H-Glucose in pmol/90 min/5 Inseln	303 ± 93,13 (12)	308,41 ± 117,1 (12)	422,26 ± 107,9 (13)
Specific yield von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Glucose	0,097 ± 0,017 (21)	0,128 ± 0,041 (22)	0,21 ± 0,039 * (19)
Specific yield von $^{14}CO_2$ aus 6-^{14}C-Glucose	0,047 ± 0,010 (20)	0,086 ± 0,019 (25)	0,072 ± 0,017 (19)
Pentose Phosphat Shunt (%)	1,83 ± 0,773 (10)	2,96 ± 1,24 (12)	5,55 ± 1,44 * (11)
Absolute Rate der Glucoseoxidation über den PPS (pmol/90 min/5 Inseln)	5,52 ± 2,33 (10)	9,12 ± 3,81 (12)	23,40 ± 6,10 * (11)

Tab. 1: Einfluß von Glucose auf die Aktivität des PPS in isolierten Langerhansschen Inseln der fötalen Ratte bei Inkubation von 5 Inseln in 1 ml KRB-Albumin Puffer während 90 Min. unter Zusatz von 5,6; 11,1 oder 16,7 mM Glucose und von Insulinantiserum um 1000 μE IRI zu binden. Gemessen wurde die Glucoseoxidation entweder von 1-^{14}C- oder 6-^{14}C-Glucose sowie die Glucoseutilisation von 5-^{3}H-Glucose. Der Betrag des 'specific yield' von $^{14}CO_2$, der Prozentsatz des PPS und die absolute Rate der Glucoseoxidation über den PPS wurden errechnet.
Mittelwerte ± SEM; Anzahl der Versuche in Klammern;
*= P < 0,05; **= P < 0,01 ***= P < 0,001 vs 5,6 u./od. 11,1 mM Glucose

	Glucose (mM)		
Foeten (21.Tag p.c.)	5,6	11,1	16,7
1-^{14}C-Glucoseoxidation (pmol/90 min/5 Inseln)	15,55 ± 9,68 (22)	23,14 ± 17,44 (23)	18,16 ± 27,05 (18)
6-^{14}C-Glucoseoxidation (pmol/90 min/5 Inseln)	14,83 ± 4,45 (23)	26,14 ± 7,62 (24)	7,15 ± 10,13 (20)
Glucoseutilisation (Bildung von THO aus 5-^{3}H-Glucose in pmol/90 min/5 Inseln)	257,00 ± 59,10 (12)	330,66 ± 125,9 (15)	432,25 ± 138,8 (12)
specific yield von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Glucose	0,060 ± 0,037 (22)	0,070 ± 0,052 (23)	0,041 ± 0,062 (18)
specific yield von $^{14}CO_2$ aus 6-^{14}C-Glucose	0,057 ± 0,017 (23)	0,079 ± 0,023 (24)	0,016 ± 0,023 (20)
Pentose Phosphat Shunt (%)	0,123 ± 1,175 (12)	0,463 ± 1,237 (12)	1,225 ± 1,427 (10)
absolute Rate der Glucoseoxidation über den PPS (pmol/90 min/5 Inseln)	1,90 ± 2,95 (12)	1,566 ± 4,090 (12)	5,297 ± 6,151 (10)

7 LITERATURVERZEICHNIS

1) WILLES RF, BODA JM, MANNS JG (1969)
INSULIN SECRETION BY THE OVINE FETUS IN UTERO.
ENDOCRINOLOGY 84: 520

2) MINTZ DH, CHEZ RA, HORGER EO (1969)
FETAL INSULIN AND GROWTH HORMONE METABOLISM IN THE SUBHUMAN PRIMATE.
J CLIN INVEST 48: 176

3) THOREEL JI (1970)
PLASMA INSULIN LEVELS IN NORMAL HUMAN FOETUSES.
ACTA ENDOCR (COPENHAVN) 63: 134-140

4) ASPLUND K, WESTMANN S, HELLERSTRÖM C (1969)
GLUCOSE STIMULATION OF INSULIN SECRETION FROM THE ISOLATED PANCREAS OF FOETAL AND NEWBORN RATS.
DIABETOLOGIA 5: 260-262

5) MILNER RDG (1969)
THE SECRETION OF INSULIN FROM FOETAL AND POSTNATAL RABBIT PANCREAS IN VITRO IN RESPONSE TO VARIOUS SUBSTANCES.
J ENDOCRIN 44: 267

6) ESPINOSA DE LOS MMA, DRISCOLL SG, STEINKE J (1970)
INSULIN RELEASE FROM ISOLATED HUMAN FETAL PANCREATIC ISLETS.
SCIENCE 168: 1111

7) RIET CORREA P, MARQUES M, KRAEMER A (1967)
INSULIN RELEASE BY FETAL CALF PANCREAS IN VITRO : INFLUENCE OF GLUCOSE OR CARBUTAMIDE
AMER J PHYSIOL 212: 1402-1404

8) ASPLUND K (1970)
THE EFFECT OF GLUCOSE ON THE INSULIN SECRETION IN FOETAL AND NEWBORN RATS.
IN: FALKMER S, HELLMAN B, TÄLJEDAL IB (eds)
THE STRUCTURE AND METABOLISM OF THE PANCREATIC ISLETS
PERGAMON PRESS LONDON pp. 477-484

9) HEINZE E, STEINKE J (1971)
GLUCOSE METABOLISM OF ISOLATED PANCREATIC ISLETS: DIFFERENCE BETWEEN FETAL, NEWBORN AND ADULT RATS.
ENDOCRINOLOGY 88: 1259-1263

10) ASHCROFT SJH, HEDESKOV CJ, RANDLE PJ (1970)
GLUCOSE METABOLISM IN MOUSE PANCREATIC ISLETS.
BIOCHEM J 118: 143-154

11) ASHCROFT SJH, WEERASINGHE LCC, BASSETT JM, RANDLE PJ (1972)
THE PENTOSE CYCLE AND INSULIN RELEASE IN MOUSE PANCREATIC ISLETS.
BIOCHEM J 126: 525-532

12) LAZAROW A, DIXIT PK, LINDALL A, MORAN J, HOSTETLER K, COOPERSTEIN SJ (1964)
ENZYME SPECIALIZATION IN ISLET TISSUE.
IN: BROLIN SE, HELLMAN B, KNUTSON H (eds)
THE STRUCTURE AND METABOLISM OF THE PANCREATIC ISLET.
PERGAMON PRESS OXFORD pp. 249-268

13) BROLIN SE, BERNE C, LINDE B (1967)
MEASUREMENT OF THE ENZYMATIC ACTIVITIES REQUIRED FOR ATP'FORMATION BY GLYCOLYSIS IN THE PANCREATIC ISLETS. OF HYPERGLYCEMIC MICE.
DIABETES 16: 21-25

14) COLL-GARCIA E, GILL JR (1969)
INSULIN RELEASE BY ISOLATED PANCREATIC ISLETS OF THE MOUSE INCUBATED IN VITRO.
DIABETOLOGIA 5: 61-66

15) HOWELL SL, YOUNG DA, LACY PE (1969)
ISOLATION AND PROPERTIES OF SECRETORY GRANULES FROM RAT ISLETS OF LANGERHANS.
J CELL BIOLOG 41: 167

16) KILO C, DEVRIM S, BAILEY R, RECANT L (1967)
STUDIES IN VIVO AND IN VITRO OF GLUCOSE-STIMULATED RELEASE OF INSULIN. THE EFFECT OF METABOLIZABLE SUGARS, TOLBUTAMIDE, AND 2-DESOXYGLUCOSE.
DIABETES 16: 377

17) GEORG RH, SUSSMAN KE, KIRSCH WL (1971)
MODIFIKATION OF GLUCOSE- AND TOLBUTAMIDE-INDUCED INSULIN RELEASE BY JODACETATE AND ANTIMYCIN A.
FED PROC INTERSOC 249: 316-321

18) RENOLD AE (1970)
INSULIN BIOSYNTHESIS AND SECRETION. A STILL UNSETTLED TOPIC.
NEW ENGL J MED 282: 173

19) KANAZAWA Y, ORCI L, LAMBERT AE (1971)
ORGAN CULTURE OF FETAL RAT PANCREAS IV.
EFFECTS OF METABOLIC INHIBITORS ON INSULIN RELEASE.
ENDOCRINOLOGY 89: 576-583

20) WEBB JL (1966)
ENZYME AND METABOLIC INHIBITORS. VOL III
ACADEMIC PRESS NEW YORK p.61

21) AMMON HPT, STEINKE J (1972)
6-AMINONICOTINAMIDE AS A DIABETOGENIC AGENT. IN VITRO AND IN VIVO STUDIES IN RATS.
DIABETES 21: 143-148

22) AMMON HPT, STEINKE J (1972)
EFFECT OF 6-AMINONICOTINAMIDE ON INSULIN RELEASE AND ^{14}C-GLUCOSE OXIDATION BY ISOLATED PANCREATIC RAT ISLETS: DIFFERENCE BETWEEN GLUCOSE, TOLBUTAMIDE AND THEOPHYLLINE.
ENDOCRINOLOGY 91: 33-38

23) AMMON HPT, WAGNER-TESCHNER D, GRIMM A, NIKLAS H (1977)
RELATIONSHIP BETWEEN NADPH, GLUTATHIONE AND GLUCOSE-INDUCED INSULIN SECRETION IN PANCREATIC RAT ISLETS.
VENEZIA JOINT MEETING OF GERMAN AND ITALIAN PHARMACOLOGISTS, ABSTRACT p. 314

24) AMMON HPT (1973)
EFFECT OF GLUCOSE AND METHYLENE BLUE ON NADP, NADPH AND INSULIN SECRETION OF ISOLATED PANCREATIC RAT ISLETS.
ARCH PHARMACOLOG 272: SUPPL R 1

25) VERSPOHL EJ, HÄNDEL M, AMMON HPT (1979)
PENTOSEPHOSPHATE SHUNT ACTIVITY OF RAT PANCREATIC ISLETS: ITS DEPENDENCE ON GLUCOSE CONCENTRATION.
ENDOCRINOLOGY 105: 1269-1274

26) IVERSEN J, MILES DW (1971)
EVIDENCE FOR A FEEDBACK INHIBITION OF INSULIN ON INSULIN SECRETION IN THE ISOLATED, PERFUSED CANINE PANCREAS.
DIABETES 20: 1-9

27) RAPOPORT AM, OHIRA S, CODDLING IA, EMPEY G, KALNIUS A, LIN BJ, HAIST RE (1972)
EFFECTS OF INSULIN OUTPUT AND ON PANCREATIC BLOOD FLOW OF EXOGENOUS INSULIN INFUSION INTO IN SITU ISOLATED PORTION OF THE PANCREAS.
ENDOCRINOLOGY 91: 168-176

28) FRERICHS H, REICH U, CREUTZFELD W (1965)
INSULIN SEKRETION IN VITRO. HEMMUNG DER GLUCOSEINDUZIERTEN INSULINABGABE DURCH INSULIN.
KLIN WSCHR 43: 136-140

29) LORETI JC, DUNBAR S CH, FOA PP (1974)
THE AUTOREGULATION OF INSULIN SECRETION IN THE ISOLATED PANCREATIC ISLET OF LEAN (obOb) AND OBESE-HYPERGLYCEMIC (obob) MICE.
DIABETOLOGIA 10: 309-315

30) AMMON HPT, VERSPOHL E (1976)
PYRIDINE NUCLEOTIDS IN PANCREATIC ISLETS DURING INHIBITION OF INSULIN RELEASE BY EXOGENOUS INSULIN.
ENDOCRINOLOGY 99: 1469-1476

31) ASSAL IPH, KATZILAMBROS L, STEINKE J
INSULIN FEEDBACK INHIBITION: METABOLIC CHANGES IN INCUBATED RAT ISLETS OF LANGERHANS.
BRIEF NOTES AND COMMENTS.

32) HANKS JH, WALLACE ER (1949)
RELATION OF OXYGEN AND TEMPERATURE IN THE PRESERVATION OF TISSUES BY REFRIGERATION.
PROC SOC EXP BIOL MED 71: 196-200

33) UMBREIT WW, BURRIS RH, STAUFFER JF (1972)
MANOMETRIC AND BIOCHEMICAL TECHNIQUES.
5th EDITION, BURGESS PUBLISHING CO., MINNEAPOLIS MINNESOTA, USA p. 146

34) FIRMA THOMAE (1977)
PERSÖNLICHE MITTEILUNGEN: 'ZUCHT VON RATTEN'

35) LACY PE, KOSTIANOVSKY M (1967)
METHOD FOR THE ISOLATION OF INTACT ISLETS OF LANGERHANS FROM RAT PANCREAS.
DIABETES 16: 35-39

36) KATZ J, WOOD HG (1963)
THE USE OF $C^{14}O_2$ YIELDS FROM GLUCOSE-1- AND -6-C^{14} FOR THE EVALUTION OF THE PATHWAYS OF GLUCOSE METABOLISM.
J BIOL CHEM 238: 517-524

37) KEEN H, FIELD JB, PASTAN IH (1963)
A SIMPLE METHOD FOR IN VITRO METABOLIC STUDIES USING SMALL VOLUMES OF TISSUE AND MEDIUM.
METABOLISM 12: 143-147

38) KISSANE JM, ROBINS E (1958)
THE FLUOROMETRIC MEASUREMENT OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID IN ANIMAL TISSUE WITH SPECIAL REFERENCE TO THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM.
J BIOL CHEM 233: 184-188

39) BECKMANN J (1979)
AN ACCURATE AND SIMPLE MICROMETHOD FOR THE DETERMINATION OF DEOXYRIBONUCLEID ACID.
N S ARCHIV PHARMACOL 307: R14 SUPPL.

40) KALLENBERGER HM (1980)
PHOSPHODIESTERASE LANGERHANSSCHER INSELN.
DISSERTATION
PHARMAZEUTISCHES INSTITUT TÜBINGEN
LEHRSTUHL FÜR PHARMAKOLOGIE

41) AGREN A, ANDERSSON A, HELLERSTRÖM C (1976)
EFFECTS OF D-GLYCERALDEHYDE AND D-GLUCOSE ON THE INSULIN RELEASE OF PANCREATIC ISLETS ISOLATED FROM THE NEWBORN RAT.
FEBS LETTERS 71: 185-188

42) SCHAUDER P, FRERICHS H (1975)
TOLBUTAMIDE-INDUCED CHANGES OF THE DNA, PROTEIN AND INSULIN CONTENT AND THE SECRETORY ACTIVITY OF ISOLATED RAT PANCREATIC ISLETS.
DIABETOLOGIA 11: 301-305

43) GREEN IC, TAYLOR KW (1972)
EFFECTS OF PREGNANCY IN THE RAT ON THE SIZE AND INSULIN SECRETORY RESPONSE OF THE ISLETS OF LANGERHANS.
J ENDOCR 54: 317-325

44) PARMAN AÜ (1975)
QUANTITATION OF ISOLATED RAT ISLETS OF LANGERHANS ON THE BASIS OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID CONTENT UNDER METABOLIC CONDITIONS OF ALTERED PROTEIN SYNTHESIS.
J HISTOCHEM CYTOCHEM 23: 187-193

45) JAHR H, GOTTSCHLING D, ZÜHLKE H (1978)
CORRELATION OF ISLET SIZE AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF ISOLATED ISLETS OF LANGERHANS OF RATS.
ACTA BIOL MED GERM 37: 659-662

46) RUTTER WJ (1969)
INDEPENDENTLY REGULATED SYNTHETIC TRANSITIONS IN FOETAL TISSUES.
IN: WOLSTENHOLME GEW, O'CONNOT M (eds)
CIBA FOUNDATION SYMPOSIUM ON FOETAL AUTONOMY
J & A CHURCHILL LTD LONDON pp. 59-76

47) CLARK CM, CAHILL GF, SOELDNER JS (1968)
EFFECTS OF EXOGENOUS INSULIN ON THE RATE OF FATTY ACID SYNTHESIS AND GLUCOSE C-14 UTILISATION IN THE TWENTY DAY RAT FETUS.
DIABETES 17: 363-368

48) GRASSO S, MESSINA A, SAPORITO N, REITANO G (1968)
SERUM-INSULIN RESPONSE TO GLUCOSE AND AMINOACIDS IN THE PREMATURE INFANT.
LANCET II: 775-757

49) LAMBERT AE, JUNOD A, STAUFFACHER W, JEANRENAUD B, RENOLD AE (1969)
ORGAN CULTURE OF FETAL RAT PANCREAS.
I. INSULIN RELEASE INDUCED BY CAFFEINE AND BY SUGARS AND SOME DERIVATIVES.
BIOCHIM BIOPHYS ACTA 184: 529-539

50) CLARK WR, RUTTER WJ (1972)
SYNTHESIS AND ACCUMULATION OF INSULIN IN THE FETAL RAT PANCREAS.
DEV BIOL 29: 468-481

51) CLARK JL, STEINER DF (1969)
INSULIN BIOSYNTHESIS IN THE RAT: DEMONSTRATION OF TWO PROINSULINS.
PROC NATL ACAD SCI USA 62: 278

52) RALL LB, PICTET RL, WILLIAMS RH, RUTTER WJ (1973)
EARLY DIFFERENTIATION OF GLUCAGON-PRODUCING CELLS IN EMBRYONIC PANCREAS: A POSSIBLE DEVELOPMENTAL ROLE OF GLUCAGON.
PROC NATL ACAD SCI USA 70: 3478

53) ASPLUND K, ANDERSSON A, JARROUSSE C, HELLERSTRÖM C (1975)
SYMPOSIUM II: FETOMATERNAL UNIT IN DIABETES. CLINICAL AND EXPERIMENTAL ASPECTS: FUNCTION OF THE FETAL ENDOCRINE PANCREAS.
ISRAEL J MED SCI 11: 581-590

54) ORCI L, LAMBERT AE, ROUILLER CH, RENOLD AE, SAMOLS E (1969)
EVIDENCE FOR THE PRESENCE OF A-CELLS IN THE ENDOCRINE FETAL PANCREAS OF THE RAT.
HORM METAB RES 1: 108-110

55) HARD WL (1944)
THE ORIGIN AND DIFFERENTIATION OF THE ALPHA AND BETA CELLS IN THE PANCREATIC ISLETS OF THE RAT.
AMER J ANAT 75: 369-403

56) NERENBERG SJ (1954)
BETA GRANULES OF ISLETS OF LANGERHANS OF THE RAT.
ARCH PATHOL 58: 236-240

57) ANGERVALL L, HELLERSTRÖM C, HELLMAN B (1962)
DEVELOPMENT OF THE ENDOCRINE PANCREAS OF RATS AS MANIFESTED BY THE APPEARANCE OF ARGYROPHILIA AND GRANULATION.
PATHOL MICROBIOL (BASEL) 25: 389-399

58) HELLMANN B (1959)
THE RELATION BETWEEN AGE AND THE B/A CELL RATIO IN THE ISLET TISSUE OF THE RAT.
ACTA ENDOCR (Kbh) 31: 80-90

59) THORELL JI, WESTERMARK P (1970)
EFFECT OF INSULIN ANTIBODIES ON GLUCOSE METABOLISM AND ON ISLETS OF LANGERHANS IN NEONATAL RATS.
ACTA SOC MED UPSAL 75: 64-69

60) ASPLUND K (1973)
EFFECTS OF GLUCOSE ON INSULIN BIOSYNTHESIS IN FOETAL AND NEWBORN RATS.
HORM METAB RES 5: 410-415

61) HEINZE E, SCHATZ H, NIERLE C, PFEIFFER EF (1975)
INSULIN BIOSYNTHESIS IN ISOLATED PANCREATIC ISLETS OF FETAL AND NEWBORN RATS.
DIABETES 24: 373-377

62) MORRIS GE, KORNER A (1970)
RNA SYNTHESIS AND THE STIMULATION OF INSULIN BIOSYNTHESIS BY GLUCOSE.
FEBS LETTERS 10: 165-168

63) PERMUTT MA, KIPNIS DM (1972)
INSULIN BIOSYNTHESIS.
II. EFFECT OF GLUCOSE ON RIBONUCLEIC ACID SYNTHESIS IN ISOLATED RAT ISLETS.
J BIOL CHEM 247: 1200-1207

64) LAMBERT AE (1970)
BIOCHEMICAL AND MORPHOLOGICAL STUDIES OF CULTURED FETAL RAT PANCREAS.
THESIS. GENEVA AND LOUVAIN

65) DURAN GARCIA S, JARROUSSE C, ROSSELIN G (1976)
BIOSYNTHESIS OF PROINSULIN AND INSULIN IN NEWBORN RAT PANCREAS. INTERACTION OF GLUCOSE, CYCLIC AMP, SOMATOSTATIN AND SULFONYLUREAS ON THE 3H-LEUCINE INCORPORATION INTO IMMUNOREACTIVE INSULIN.
J CLIN INVEST 57: 230-243

66) HEINZE E, STEINKE J (1972)
INSULIN SECRETION DURING DEVELOPMENT: RESPONSE OF ISOLATED PANCREATIC ISLETS OF FETAL, NEWBORN AND ADULT RATS TO THEOPHYLLINE AND ARGININE.
HORM METAB RES 4: 234-236

67) ASPLUND K (1973)
DYNAMICS OF INSULIN RELEASE FROM THE FOETAL AND NEONATAL RAT PANCREAS.
EUR J CLIN INVEST 3: 338-344

68) SODOYEZ-GOFFAUX F, SODOYEZ JC, DE VOS CL J, FOA PP (1979)
INSULIN AND GLUCAGON SECRETION BY ISLETS ISOLATED FROM FETAL AND NEONATAL RATS.
DIABETOLOGIA 16: 121-123

69) SODOYEZ-GOFFAUX F, SODOYEZ JC, DE VOS CL J (1979)
INSULIN SECRETION AND METABOLISM DURING THE PERINATAL PERIOD IN THE RAT.
J CLIN INVEST 63: 1095-1102

70) GRILL V, ADAMSON U, CERASIE (1978)
IMMEDIATE AND TIME-DEPENDENT EFFECTS OF GLUCOSE ON INSULIN RELEASE FROM RAT PANCREATIC TISSUE. EVIDENCE FOR DIFFERENT MECHANISMS OF ACTION.
J CLIN INVEST 61: 1034-1043

71) GRODSKY GM, CURRY D, LANDAHL H, BENNETT L (1969)
FURTHER STUDIES ON THE DYNAMIC ASPECTS OF INSULIN RELEASE IN VITRO WITH EVIDENCE FOR A TWO-COMPARTMENTAL STORAGE SYSTEM.
ACTA DIABETOL LAT 6 (SUPPL 1): 554-579

72) ASPLUND K (1973)
EFFECTS OF INTERMITTENT GLUCOSE INFUSIONS IN PREGNANT RATS ON THE FUNCTIONAL DEVELOPMENT OF THE FOETAL PANCREATIC B-CELLS.
J ENDOCR 59: 285-293

73) VAN ASSCHE FA (1970)
THE FETAL ENDOCRINE PANCREAS. A QUANTITATIVE MORPHOLOGICAL APPROACH.
M D THESIS, UNIVERSITY OF LEUVEN

74) JØRGENSEN KR, DECKERT T, MØLSTED-PEDERSEN L, PEDERSEN J (1966)
INSULIN, INSULIN ANTIBODY AND GLUCOSE IN PLASMA OF NEWBORN INFANTS OF DIABETIC WOMEN.
ACTA ENDOCR (COPENHAVN) 52: 154-167

75) THOMAS K, DE GASPARO M, HOET JJ (1967)
INSULIN LEVELS IN THE UMBILICAL VEIN AND IN THE UMBILICAL ARTERY OF NEWBORNS OF NORMAL AND GESTATIONAL DIABETIC MOTHERS.
DIABETOLOGIA 3: 299-304

76) BAIRD JD, FARQUHAR JW (1962)
INSULIN-SECRETING CAPACITY IN NEWBORN INFANTS OF NORMAL AND DIABETIC WOMEN.
LANCET I: 71-74

77) ASHCROFT SJH, CROSSLEY JR (1975)
THE EFFECTS OF GLUCOSE, N-ACETYLGLUCOSAMINE, GLYCERALDEHYDE AND OTHER SUGARS ON INSULIN RELEASE IN VIVO.
DIABETOLOGIA 11: 279-284

78) ANDERSSON A, GRILL V, ASPLUND K, BERNE C, AGREN A, HELLERSTRÖM C (1975)
EARLY DIABETES IN EARLY LIFE.
IN: CAMERINI-DAVALOS R, COLE HS (eds)
ACADEMIC PRESS INC NEW YORK pp. 49-56

79) ASHCROFT SJH, RANDLE PJ (1970)
ENZYMES OF GLUCOSE METABOLISM IN NORMAL MOUSE PANCREATIC ISLETS.
BIOCHEM J 119: 5-15

80) ASHCROFT SJH, WEERASINGHE LCC, RANDLE PJ (1973)
INTERRELATIONSHIP OF ISLET METABOLISM, ADENOSINE TRIPHOSPHATE CONTENT AND INSULIN RELEASE.
BIOCHEM J 132: 223-231

81) HELLMAN B, IDAHL L-A, LERNMARK A, SEHLIN J, TÄLJEDAL I-B (1974)
THE PANCREATIC B-CELL RECOGNITION OF INSULIN SECRETAGOGUES. COMPARISONS OF GLUCOSE WITH GLYCERALDEHYDE ISOMERS AND DIHYDROXYACETONE.
ARCH BIOCHEM BIOPHYS 162: 448-457

82) JAIN K, LOGOTHETOPOULOS J, ZUCKER P (1975)
THE EFFECTS OF D-AND L-GLYCERALDEHYDE ON GLUCOSE-OXIDATION, INSULIN SECRETION AND INSULIN BIOSYNTHESIS BY PANCREATIC ISLETS OF THE RAT.
BIOCHIM BIOPHYS ACTA 399: 384-394

83) CERASI E, GRILL V (1977)
DIE ROLLE DES ZYKLISCHEN AMP BEI DER KONTROLLE DER INSULINSEKRETION.
MÜNCH MED WSCHR 119: 1229-1236

84) GRILL V (1977)
CYCLIC AMP AND INSULIN RELEASE.
ACTA PAEDIATR SCAND (SUPPL) 270: 41-47

85) LAMBERT AE (1976)
THE REGULATION OF INSULIN SECRETION.
REVIEW PHYSIOL BIOL PHARMACOL 75: 97-157

86) MONTAGUE W, HOWELL SL (1975)
CYCLIC AMP AND THE PHYSIOLOGY OF THE ISLETS OF LANGERHANS.
ADV CYCL NUCL RES 6: 201-243

87) MALAISSE WJ, MALAISSE-LAGAE F, MEYHEW D (1967)
A POSSIBLE ROLE FOR THE ADENYLCYCLASE-SYSTEM IN INSULIN SECRETION.
J CLIN INVEST 46: 1724-1734

88) SHARP GWG, WOLLHEIM C, MÜLLER WA, GUTZEIT A, TRUEHART PA, BLONDEL B, ORCI L, RENOLD AE (1975)
STUDIES ON THE MECHANISM OF INSULIN RELEASE.
FED PROC 34: 1537-1548

89) GRILL V, CERASI E (1974)
STIMULATION BY D-GLUCOSE OF CYCLIC ADENOSINE-3,5-MONOPHOSPHATE ACCUMULATION AND INSULIN RELEASE IN ISOLATED PANCREATIC ISLETS OF THE RAT.
J BIOL CHEM 249: 4196-4200

90) HELLMAN B, IDAHL LA, LERNMARK A, TÄLJEDAL IB (1974)
THE PANCREATIC B-CELL RECOGNITION OF INSULIN SECRETAGOGUES. DOES CYCLIC AMP MEDIATE THE EFFECT OF GLUCOSE?
PROC NAT ACAD SCI 71: 3405-3409

91) LAMBERT AE, JEANRENAUD B, JUNOD A, RENOLD AE (1969)
ORGAN CULTURE OF FETAL RAT PANCREAS.
II. INSULIN RELEASE INDUCED BY AMINO ORGANIC ACIDS, BY HORMONAL PEPTIDES, BY CATIONIC ALTERATIONS OF THE MEDIUM AND BY OTHER AGENTS.
BIOCHIM BIOPHYS ACTA 174: 540-553

92) LAMBERT AE, KANAZAWA Y, BURR IA, ORCI L, RENOLD AE (1971)
ON THE ROLE OF CYCLIC AMP IN INSULIN RELEASE:
I. OVERALL EFFECTS IN CULTURED FETAL RAT PANCREAS.
ANN NY ACAD SCI 185: 232-244

93) LAMBERT AE, KANAZAWA Y, HALTER JB, ORCI L, RUILLER C, RENOLD AE (1970)
INSULIN RELEASE FROM FETAL AND NEWBORN RAT PANCREAS IN VITRO: ROLE OF THE ADENYL CYCLASE SYSTEM.
ACTA DIABET LAT 7 (SUPPL): 229-261

94) GRASSO S, MESSINA A, SAPORITO N, REITANO G (1970)
EFFECT OF THEOPHYLLINE, GLUCAGON AND THEOPHYLLINE PLUS GLUCAGON ON INSULIN SECRETION IN THE PREMATURE INFANT.
DIABETES 19: 837-841

95) GRILL V, ASPLUND K, HELLERSTRÖM C, CERASI E (1975)
DECREASED CYCLIC AMP AND INSULIN RESPONSE TO GLUCOSE IN ISOLATED ISLETS OF NEONATAL RATS.
DIABETES 24: 746-752

96) LAMBERT AE, JEANRENAUD B, RENOLD AE (1967)
ENHANCEMENT BY CAFFEINE OF GLUCAGON-INDUCED AND TOLBUTAMIDE-INDUCED INSULIN RELEASE FROM ISOLATED FOETAL PANCREATIC TISSUE.
LANCET I: 819-820

97) MINTZ DH, LEVEY GS, SCHENK A (1973)
ADENOSINE 3',5'-CYCLIC MONOPHOSPHATE AND PHOSPHODIESTERASE ACTIVITIES IN ISOLATED FETAL AND NEONATAL RAT PANCREATIC ISLETS.
ENDOCRINOLOGY 92: 614-617

98) FAJANS SS, FLOYD JR JC, KNOPF RF, PEK S, WEISSMAN P, CONN JW (1972)
AMINO ACIDS AND INSULIN RELEASE IN VIVO.
ISRAEL J MED SCI 8: 233-243

99) FLOYD JR JC, FAJANS SS, CONN JW, KNOPF RF, RULL J (1966)
STIMULATION OF INSULIN SECRETION BY AMINO ACIDS.
J CLIN INVEST 45: 1487

100) MALAISSE W, MALAISSE-LAGAE F (1968)
STIMULATION OF INSULIN SECRETION BY NONCARBOHYDRATE METABOLITES.
J LAB CLIN MED 72: 438-448

101) LAMBERT AE, JEANRENAUD B, JUNOD A, RENOLD AE (1969)
INSULIN RELEASE INDUCED BY AMINO ACIDS.
BIOCHEM BIOPHYS ACTA 174: 540-553

102) GRASSO S, MESSINA A, DISTEFANO G, VIGO R, REITANO G (1973)
INSULIN SECRETION IN THE PREMATURE INFANT. RESPONSE TO GLUCOSE AND AMINO ACIDS.
DIABETES 22: 349-353

103) HEINZE E, BEISCHER W, OSORIO J, PFEIFFER EF (1975)
INSULIN SECRETION IN THE PERINATAL PERIOD OF THE RAT. IN VIVO AND IN VITRO EFFECTS OF GLUCOSE AND GLIBENCLAMIDE (HB 419).
DIABETOLOGIA 11: 313-320

104) HELLMAN B, IDAHL LA, LERNMARK A, SEHLIN J, SIMON E, TÄLJEDAL IB (1972)
THE PANCREATIC B-CELL RECOGNITION OF INSULIN SECRETAGOGUES. I. TRANSPORT OF MANNOHEPTULOSE AND THE DYNAMICS OF INSULIN RELEASE.
MOLEC PHARMACOL 8: 1-7

105) SEHLIN J (1973)
EFFECTS OF MANNOHEPTULOSE ON THE DYNAMICS OF GLUCOSE OXIDATION IN THE PANCREATIC B-CELLS.
FEBS LETTERS 30: 45-48

106) GRODSKY GM, BATTS AA, BENNET LL, VCELLA C, MCWILLIAMS NB, SMITH DF (1963)
EFFECTS OF CARBOHYDRATES ON SECRETION OF INSULIN FROM ISOLATED RAT PANCREAS.
AM J PHYSIOL 205: 638-644

107) ASHCROFT SJH, BASSET JM, RANDLE PJ (1972)
INSULIN SECRETION MECHANISM AND GLUCOSE METABOLISM IN ISOLATED ISLETS.
DIABETES 21: 538-545 (SUPPL) 2

108) HELLMAN B, IDAHL LA, LERNMARK A, SEHLIN J, TÄLJEDAL IB (1974)
THE PANCREATIC B-CELL RECOGNITION OF INSULIN SECRETAGOGUES. EFFECTS OF CALCIUM AND SODIUM ON GLUCOSE METABOLISM AND INSULINRELEASE.
BIOCHEM J 138: 33-45

109) BASSET DJP, FISHER AB (1976)
PENTOSE CYCLE ACTIVITY OF THE ISOLATED PERFUSED RAT LUNG.
AM J PHYSIOL 231: 1527-1532

110) KATZ J, WALS PA (1972)
PENTOSE CYCLE AND REDUCING ÄQUIVALENTS IN RAT MAMMARY-GLAND SLICES.
BIOCHEM J 128: 879

111) JACOB HS, JANDEL JH (1966)
PENTOSE CYCLE IN ERYTHROCYTS.
J BIOL CHEM 241: 42-43

112) AKHTAR MS, VERSPOHL E, HEGNER D, AMMON HPT (1977)
6-PHOSPHOGLUCONATE/GLUCOSE-6-PHOSPHATE RATIO IN RAT PANCREATIC ISLETS DURING INHIBITION OF INSULIN RELEASE BY EXOGENOUS INSULIN.
DIABETES 26: 857-863

113) MONTAGUE W, TAYLOR KW (1968)
PENITOLS AND INSULIN RELEASE BY ISOLATED RAT ISLETS OF LANGERHANS.
BIOCHEM J 109: 333-339

114) MONTAGUE W, TAYLOR KW (1970)
THE ROLE OF THE PENTOSE PHOSPHATE PATHWAY IN INSULIN SECRETION.
IN: FALKMER S, HELLMAN B, TÄLJEDAL IB (eds)
THE STRUCTURE AND METABOLISM OF PANCREATIC ISLETS.
PERGAMON PRESS OXFORD pp. 263-274

115) COPER H, HADASS H, LISON H (1966)
UNTERSUCHUNGEN ZUM MECHANISMUS ZENTRAL NERVÖSER FUNKTIONSSTÖRUNGEN DURCH 6-AN.
N S ARCH EXP PATHOL PHARMAKOL 255: 97-106

116) HERKEN H (1968)
BIOSYNTHESIS AND ACTION OF DINUCLEOTIDES CONTAINING 6-AMINONICOTINAMIDE ON MEMBRAN TRANSPORT PROCESSES.
ARZNEIMITTELFORSCHUNG 18: 1235-1245

117) WAGNER-TESCHNER D (1977)
EINFLUSS DER GLUCOSEKONZENTRATION AUF DEN NADP- UND NADPH-GEHALT SOWIE DIE GLUCOSEINDUZIERTE INSULINSEKRETION LANGERHANSSCHER INSELN VON GEFÜTTERTEN UND GEHUNGERTEN RATTEN.
DIPLOMARBEIT: FACHBEREICH CHEMIE-BIOCHEMIE TÜBINGEN

118) AMMON HPT, PATEL TN, STEINKE J (1973)
THE ROLE OF PENTOSE PHOSPHATE SHUNT IN GLUCOSE-INDUCED INSULIN RELEASE: IN VITRO STUDIES WITH 6-AMINONICOTINAMIDE, METHYLENE BLUE, NAD, NADH, NADP, NADPH AND NICOTINAMIDE ON ISOLATED PANCREATIC ISLETS.
BIOCHIM BIOPHYS ACTA 297: 352-367

119) AMMON HPT (1974)
EFFECT OF INSULIN ON PYRIDINNUCLEOTIDES IN PANCREATIC ISLETS.
N S ARCH PHARMACOL 282: R2 (SUPPL)

120) AMMON HPT, VERSPOHL E (1976)
PYRIDINE NUCLEOTIDES IN PANCREATIC ISLETS DURING INHIBITION OF INSULIN RELEASE BY EXOGENOUS INSULIN.
ENDOCRINOLOGY 99: 1469-1476

121) AMMON HPT, BUMILLER G (1981)
UNVERÖFFENTLICHTE DATEN

122) MATSCHINSKY FM, KAUFFMAN FC, ELLERMAN JE (1968)
EFFECTS OF HYPERGLYCAEMICA ON THE HEXOSE MONOPHOSPHATE SHUNT IN ISLETS OF LANGERHANS.
DIABETES 17: 475-480

123) FIELD JB, JOHNSON P, HERRING B, WEINBERG AN (1960)
EVIDENCE FOR HEXOSE-MONOPHOSPHATE PATHWAY FOR GLUCOSE METABOLISM IN HUMAN PANCREATIC-CELLS.
NATURE 185: 468-469

124) BLOOM GD, HELLMAN B, IDAHL LA, LERNMARK A, SEHLIN J, TÄLJEDAL I-B (1972)
EFFECTS OF ORGANIC MERCURIALS ON MAMMALIAN PANCREATIC B-CELLS. INSULIN RELEASE, GLUCOSE TRANSPORT, GLUCOSE OXIDATION, MEMBRANE PERMEABILITY AND ULTRASTRUCTURE.
BIOCHEM J 129: 241-254

125) AMMON HPT, AKHTAR MS, NIKLAS H, HEGNER D (1977)
INHIBITION OF p-CHLOROMERCURIBENZOATE- AND GLUCOSE-INDUCED INSULIN RELEASE IN VITRO BY METHYLENE BLUE, DIAMIDE, AND TERT-BUTYL HYDROPEROXIDE.
MOL PHARMACOL 13: 598-605

126) DOUGLAS WW, ISHIDA A, POISNER AM (1965)
THE EFFECT OF METABOLIC INHIBITORS ON THE RELEASE OF VASOPRESSIN FROM THE ISOLATED NEUROHYPOPHYSIS.
J PHYSIOL 181: 753-759

127) SCHOFIELD JG (1971)
EFFECT OF SULPHYDRYL REAGENTS ON THE RELEASE OF GROWTH HORMONE IN VITRO.
BIOCHIM BIOPHYS ACTA 252: 516-526

128) HELLMAN B, IDAHL LA, SEHLIN J, TÄLJEDAL I-B (1974)
MEMBRANE SULPHYDRYL GROUPS AND THE PANCREATIC BETA CELL RECOGNITION OF INSULIN SECRETAGOGUES.
PROC 8th CONGRESS INTERN DIABET FEDER
EXCERPTA MEDICA AMSTERDAM

129) GRIMM A (1978)
GLUTATHION UND INSULINSEKRETION: MIKROMETHODEN ZUR BESTIMMUNG REDUZIERTEN UND OXIDIERTEN GLUTATHIONS IN LANGERHANSSCHEN INSELN. BEZIEHUNGEN ZWISCHEN DEM GSH/GSSG-QUOTIENTEN UND GLUCOSEINDUZIERTER INSULIN-SEKRETION.
DISSERTATION
PHARMAZEUTISCHES INSTITUT TÜBINGEN
LEHRSTUHL FÜR PHARMAKOLOGIE

130) ASHCROFT SJH, CHRISTIE MR (1979)
EFFECTS OF GLUCOSE ON THE CYTOSOLIC RATIO OF REDUCED/OXIDIZED NICOTINAMIDE-ADENINE DINUCLEOTIDE PHOSPHATE IN RAT ISLETS OF LANGERHANS.
BIOCHEM J 184: 697-700

131) BERNE C (1975)
NICOTINAMIDE ADENINE DINUCLEOTIDE PHOSPHATE-CONVERTING ENZYMES AND ADENOSINE TRIPHOSPHATE CITRATE LYASE IN SOME TISSUES AND ORGANS OF NEW ZEALAND OBESE MICE WITH SPECIAL REFERENCE TO THE ENZYME PATTERN OF THE PANCREATIC ISLETS.
J HISTOCHEM CYTOCHEM 23: 660-665

132) BEUTLER E
GLUTATHIONE REDUCTASE.
IN: FLOHE L, BENÖHR HC, SIES H, WALLER HD, WENDEL A (eds)
GLUTATHIONE
GEORG THIEME VERLAG STUTTGART

133) AMMON HPT, AKHTAR MS, GRIMM A, NIKLAS H (1979)
EFFECT OF METHYLENE BLUE AND THIOL OXIDANTS ON PANCREATIC ISLET GSH/GSSG RATIOS AND TOLBUTAMIDE MEDIATED INSULIN RELEASE IN VITRO.
N S ARCH PHARMACOL 307: 91-96

134) PILLION DJ, LEIBACH FH (1975)
THE EFFECT OF DIAMIDE AND GLUTATHIONE ON THE UPTAKE OF -METHYL-D-GLUCOSIDE BY SLICES OF RAT KIDNEY CORTEX.
BIOCHIM BIOPHYS ACTA 382: 246-252

135) KOSOWER NS, KOSOWER EM, WERTHEIM B, CORREA WS (1969)
DIAMIDE, A NEW REAGENT FOR THE INTRACELLULAR OXIDATION OF GLUTATHIONE TO THE DISULFIDE.
BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN 37: 593-596

136) KOSOWER EM, CORREA WS, KINON BJ, KOSOWER NS (1972)
GLUTATHIONE VIII. DIFFERENCE AMONG SUBSTRATES BY THE THIOL OXIDIZING AGENT DIAMIDE.
BIOCHIM BIOPHYS ACTA 264: 39-44

137) SRIVASTAVA SK, AWASTHI YC, BEUTLER E (1974)
USEFUL AGENTS FOR THE STUDY OF GLUTATHIONE METABOLISM IN ERYTHROCYTES-ORGANIC HYDROPEROXIDES.
BIOCHEM J 139: 289-295

138) SIES C, GERSTENECKER C, MENZEL H, FLOHE L (1972)
OXIDATION IN THE NADP SYSTEM AND RELEASE OF GSSG FROM HEMOGLOBIN FREE PERFUSED RAT LIVER DURING PEROXIDATIC OXIDATION OF GLUTATHIONE BY HYDROPEROXIDES.
FEBS LETTERS 27: 171-175

139) KOSOWER EM, KOSOWER NS, KANETY-LONDNER H, LEVI L (1974)
GLUTATHIONE IX. NEW THIOL-OXIDIZING AGENTS, DIP, DIP+1, DIP+2.
BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN 59: 347-351

140) EUJEN R (1979)
ZUR ROLLE DES REDUZIERTEN GLUTATHIONS LANGERHANSSCHER INSELN DER RATTE BEI DER SEKRETION VON INSULIN
DISSERTATION
PHARMAZEUTISCHES INSTITUT TÜBINGEN
LEHRSTUHL FÜR PHARMAKOLOGIE

141) HEDESKOV CJ, HERTZ L, NISSEN C (1972)
THE EFFECT OF MANNOHEPTULOSE ON GLUCOSE- AND PYRUVATE-STIMULATED OXYGEN UPTAKE IN NORMAL MOUSE PANCREATIC ISLETS.
BIOCHIM BIOPHYS ACTA 261: 388-397

142) HAHN HJ, MICHAEL R, KANSY H (1970)
UNTERSUCHUNGEN AN LANGERHANSSCHEN INSELN IN VITRO. VI. DER EINFLUSS DER INSELGRÖSSE AUF DIE INSULINSEKRETION.
ACTA BIOL MED GERM 25: 939-943

143) LUTZ S (1981)
UNTERSUCHUNGEN ZUM REDOXSTATUS DES GLUTATHIONSYSTEMS IN DER LANGERHANSSCHEN INSEL DER RATTE.
EINFLUSS VON PERINATALZEIT, EXOGENEM INSULIN UND LEUCIN.
DISSERTATION IN VORBEREITUNG
PHARMAZEUTISCHES INSTITUT TÜBINGEN
LEHRSTUHL FÜR PHARMAKOLOGIE

Lebenslauf

Name:	Düppenbecker, Heribert
Geburtsdatum:	26. Juli 1951
Staatsangeh.:	deutsch
Familienstand:	verheiratet
Eltern:	Düppenbecker, Paul und Düppenbecker, Maria Luise, geb. Rolshoven

Schulbildung:

April	1958	Einschulung, Volksschule Geseke
	1959	Volksschule Bielefeld
	1962	Max-Planck-Gymnasium Bielefeld
	1965	Reismann-Schule Paderborn
Mai	1971	Abitur

Studienzeit:

Aug.	1971	Praktikantenzeit in der Westfalen-Apotheke in Elsen
Sept.	1973	Pharmazeutische Vorprüfung in Detmold
Nov.	1973	Studium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
Dez.	1975	1. Abschnitt der Pharm. Prüfung
Aug.	1977	2. Abschnitt der Pharm. Prüfung
Okt.	1977	Approbation als Apotheker
Nov.	1977	Doktorand am Lehrstuhl für Pharmakologie des Pharmazeutischen Instituts der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen, bei Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon, unter dessen Anleitung die Dissertation "Einfluß der Glucosekonzentration auf die Glucoseutilisation, die Glucoseoxidation sowie die Pentosephosphatshunt-Aktivität bei Langerhansschen Inseln von fötalen, neugeborenen und trächtigen Ratten" angefertigt und im Mai 1981 abgeschlossen wurde.

Meine akademischen Lehrer außer Herrn Professor Dr. H.P.T. Ammon waren die Herren Professoren H. Auterhoff und K.-A. Kovar (Pharm. Chemie), E. Graf (Pharm Technologie), E. Reinhard (Pharm Biologie), R. E. Bader (Medizinische Mikrobiologie), E. Müller und W. Rüdorff (Chemie), H. Krüger und H. Seiler (Physik) und M. Siess (Pharmakologie).

Druck und Gesamtherstellung:

Bölk & Schulz · Kopier- und Drucktechnik
Bismarckstr. 92
7400 Tübingen · Tel. 07071/32321